

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year) 09 November 2000 (09.11.00)	To: Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
International application No. PCT/EP99/07127	Applicant's or agent's file reference P 51759
International filing date (day/month/year) 27 September 1999 (27.09.99)	Priority date (day/month/year) 26 March 1999 (26.03.99)
Applicant KRUPP, Guido	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

12 October 2000 (12.10.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Claudio Borton Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

REPLACED BY
ART 34 AMDT

Patent claims:

1. Process for the amplification and quantitative real-time detection of nucleic acids, characterized in that
 - a) a primer is used to which a nucleic acid sequence, preferably with a length of 1 to 40 nucleotides, is attached, which codes for the sequence motif 5'-GAAA-3' (motif A) in the transcript,
 - b) the amplification being carried out in the presence of an excess, preferably in a concentration of 50 to 500 nM, of a nucleic acid probe, preferably with a length of 25 to 60 nucleotides (particularly preferably approx. 50 nucleotides) which contains the sequence motif 5'-CUGANGA-3' (motif B), a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each probe molecule, and
 - c) the original concentration of the nucleic acid in the sample is determined by measuring the time-dependent change in fluorescence during amplification, the relative concentration "C_{rel.}" being determined according to the following formula:

$$C_{\text{rel.}} = t_p / t_{\text{ref.}}$$

where

t_p corresponds to the time measured for the sample from the start of amplification to the reaching of the fluorescence threshold value and

t_{ref.} corresponds to time measured for a reference nucleic acid of known concentration from the start of amplification to the reaching of the fluorescence threshold value.

2. Process for the amplification and quantitative real-time detection of nucleic acids, characterized in that
 - a) a primer is used to which a nucleic acid sequence, preferably with a length of 1 to 40 nucleotides, is

attached, which codes for the sequence motif 5'-CUGANGA-3' (motif B) in the transcript,

- b) the amplification is carried out in the presence of an excess, preferably in a concentration of 50 to 500 nM, of a nucleic acid probe, preferably with a length of 25 to 60 nucleotides (particularly preferably approx. 50 nucleotides) which contains the sequence motif 5'-GAAA-3' (motif A), a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each probe molecule, and
- c) the original concentration of the nucleic acid in the sample is determined by measuring the time-dependent change in fluorescence during the amplification, the relative concentration "C_{rel.}" being determined according to the following formula:

$$C_{\text{rel.}} = t_f / t_{\text{ref.}}$$

where

t_f corresponds to the time measured for the sample from the start of the amplification to the reaching of the fluorescence threshold value and

t_{ref.} corresponds to time measured for a reference nucleic acid of known concentration from the start of the amplification to the reaching of the fluorescence threshold value.

3. Process for the amplification and quantitative real-time detection of a nucleic acid containing the sequence motif 5'-GAAA-3' (motif A), characterized in that

- a) the sequences of the primers used are chosen such that the sequence range of the nucleic acid which contains motif A is amplified,
- b) the amplification being carried out in the presence of an excess of a nucleic acid probe which contains the

sequence motif 5'-CUGANGA-3' (motif B), a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each probe molecule, and

c) the original concentration of the nucleic acid in the sample is determined by measuring the time-dependent change in fluorescence during the amplification, the relative concentration "C_{rel.}" being determined according to the following formula:

$$C_{\text{rel.}} = t_p / t_{\text{ref.}}$$

where

t_p corresponds to the time measured for the sample from the start of the amplification to the reaching of the fluorescence threshold value and

t_{ref.} corresponds to the time measured for a reference nucleic acid of known concentration from the start of the amplification to the reaching of the fluorescence threshold value.

4. Process for the amplification and quantitative detection of a nucleic acid containing the sequence motif 5'-CUGANGA-3' (motif B), characterized in that

a) the sequences of the primers used are chosen such that the sequence range of the nucleic acid which contains motif B is amplified,

b) the amplification being carried out in the presence of an excess of a nucleic acid probe which contains the sequence motif 5'-GAAA-3' (motif A), a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each probe molecule, and

c) the original concentration of the nucleic acid in the sample is determined by measuring the time-dependent change in fluorescence during the amplification, the relative concentration "C_{rel.}" being determined according to the following formula:

$$C_{rel.} = t_r / t_{Ref.}$$

where

t_r corresponds to the time measured for the sample from the start of the amplification to the reaching of the fluorescence threshold value and

$t_{Ref.}$ corresponds to the time measured for a reference RNA of known concentration from the start of the amplification to the reaching of the fluorescence threshold value.

5. Process according to claims 1 to 4, characterized in that the nucleic acid is RNA, DNA or a DNA/RNA chimera.
6. Process according to claims 1 to 5, characterized in that the nucleic acid sequence attached to the primer has a length of 1 to 40 nucleotides.
7. Process according to claims 1 to 6, characterized in that the nucleic acid probe is used in a concentration of 50 to 500 nM.
8. Process according to claims 1 to 7, characterized in that the nucleic acid probe has a length of 25 to 60 nucleotides, preferably approx. 50 nucleotides.
9. Process according to claims 1 to 8, characterized in that the amplification process is an isothermal or cyclical amplification process.
10. Process according to claim 9, characterized in that the amplification process is selected from the group consisting of NASBA[®], TMA, 3SR or PCR.
11. Process according to claims 1 to 10, characterized in that there is used, as reporter, a dye from the group consisting of FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 or La Jolla Blue and, as quencher, a dye from the group consisting of TAMRA, CY-5, DABCYL and LCR.

12. Process for the detection of nucleic acids which contain the sequence motif 5'-GAAA-3' (motif A), characterized in that a sample containing the nucleic acid is brought into contact with a probe which contains the sequence motif 5'-CUGANGA-3' (motif B), a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each sequence motif, the probe having a sequence suitable for the hybridization with the nucleic acid to be detected.
13. Process for the detection of nucleic acids which contain the sequence motif 5'-CUGANGA-3' (motif B), in which a sample containing the nucleic acid is brought into contact with a probe which contains the sequence motif 5'-GAAA-3' (motif A), a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each probe molecule, the probe having a sequence suitable for hybridization with the nucleic acid to be detected .
14. Process according to claim 12 or 13, characterized in that the nucleic acid is RNA, DNA or a DNA/RNA chimera.
15. Process according to claims 12 to 14, characterized in that the nucleic acid sequence attached to the primer has a length of 1 to 40 nucleotides.
16. Process according to claims 12 to 15, characterized in that the nucleic acid probe has a length of 25 to 60 nucleotides, preferably approx. 50 nucleotides.
17. Process according to claims 12 to 16, characterized in that there is used, as reporter, a dye from the group consisting of FAM, HEX, TEX, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, I RD 700, CY-7, I RD 41 or La Jolla Blue and, as quencher, a dye from the group consisting of TAMRA, CY-5, DABCYL and LCR.
18. Kit for carrying out the process according to claim 1, characterized in that it comprises
 - a) an amplification primer to which a nucleic acid sequence is attached which codes for the sequence motif 5'-GAAA-3' in the transcript,
 - b) a further amplification primer,
 - c) enzymes and reagents for carrying out the amplification,

- d) a nucleic acid probe which contains the sequence motif 5'-CUGA_nGA-3', a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each probe molecule, as well as optionally
- e) apparatus and auxiliaries necessary for carrying out the reaction.

19. Kit for carrying out the process according to claim 2,
characterized in that it comprises

- a) an amplification primer to which a nucleic acid sequence is attached which codes for the sequence motif 5'-CUGA_nGA-3' in the transcript,
- b) a further amplification primer,
- c) enzymes and reagents for carrying out the amplification,
- d) a nucleic acid probe which contains the sequence motif 5'-GAAA-3', a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each probe molecule, as well as optionally
- e) apparatus and auxiliaries necessary for carrying out the reaction.

20. Kit for carrying out the process according to claim 3,
characterized in that it comprises

- a) two amplification primers,
- b) enzymes for carrying out the amplification,
- c) a nucleic acid probe which contains the sequence motif 5'-CUGA_nGA-3', a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each probe molecule, as well as optionally
- d) apparatus and auxiliaries necessary for carrying out the reaction.

21. Kit for carrying out the process according to claim 4,
characterized in that it comprises

- a) two amplification primers,
- b) enzymes for carrying out the amplification,
- c) a nucleic acid probe which contains the sequence motif 5'-GAAA-3', a reporter molecule and a quencher molecule

being attached to each probe molecule, as well as
optionally

- d) apparatus and auxiliaries necessary for carrying out the reaction.

22. Kit according to claims 18 to 21, characterized in that the nucleic acid is RNA, DNA or a DNA/RNA chimera.

23. Kit according to claims 18 to 22, characterized in that the nucleic acid sequence attached to the primer has a length of 1 to 40 nucleotides.

24. Kit according to claims 18 to 23, characterized in that the nucleic acid probe is used in a concentration of 50 to 500 nM.

25. Kit according to claims 18 to 24, characterized in that the nucleic acid probe has a length of 25 to 60 nucleotides, preferably approx. 50 nucleotides.

26. Kit according to claims 18 to 25, characterized in that the amplification process is an isothermal or cyclical amplification process.

27. Kit according to claim 26, characterized in that the amplification process is selected from the group consisting of NASBA®, TMA, 3SR or PCR.

28. Kit according to claim 27, characterized in that it is a kit for carrying out a NASBA®, the enzymes displaying the activity of reverse transcriptase, T7 RNA polymerase and RNase H.

29. Kit according to claim 28, characterized in that the enzymes for carrying out the NASBA® are reverse transcriptase, T7 RNA polymerase and RNase H.

30. Kit for carrying out the process according to one of claims 12 or 13, characterized in that it comprises a probe with a sequence suitable for the hybridization with the nucleic acid to be detected, which contains the sequence motif 5'-CUGANGA-3' (motif B) or 5'-GAAA-3' (motif A), a reporter molecule and a quencher molecule being attached to each probe molecule, as

well as optionally further apparatus and auxiliaries necessary for carrying out the reaction.

31. Kit according to claims 18 to 30, characterized in that the reporter is a dye from the group consisting of FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 or La Jolla Blue and the quencher a dye from the group consisting of TAMRA, CY-5, DABCYL, and LCR.

Detection of Nucleic Acid Amplification Products

Die vorliegende Patentanmeldung betrifft insbesondere Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung der Verfahren.

5 Zur Vervielfältigung von Desoxyribonucleinsäuren (DNA) oder Ribonucleinsäuren (RNA) wurden bislang verschiedene Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT), wie zum Beispiel Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA[®]), entwickelt. Auf diesen Amplifikationstechniken 10 basierende Assays werden beispielsweise für den hochsensitiven Nachweis und/oder die Quantifizierung von Erregern im medizinisch-diagnostischen Bereich eingesetzt.

DNA-Amplifikationstechniken wie PCR führen zur Erzeugung großer 15 Mengen amplifizierter Target-DNA (oder über einen initialen Reverse Transkriptase-Schritt zu amplifizierter RNA). Üblicherweise werden die Amplifikationsprodukte nach einer definierten Zeit mit Hilfe von Post-Amplifikationsmethoden - im allgemeinen durch Hybridisierung - nachgewiesen (Endpunktanalyse).

20

Gemäß einem neuen Ansatz - "TaqMan[®]" - zur quantitativen PCR wird Fluorescence Resonance Transfer (FRET; vgl. Heid et al., Genome Res. 6 (1996) 986-994) mit doppelt fluoreszenzmarkierten DNA-

Sonden zur Echtzeitdetektion der DNA-Amplifikation vorgeschlagen). Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Sonde am Target haften bleibt, bis sie durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase entfernt wird. Die Stringenz ist aufgrund des 5 Temperaturprofils der PCR nur sehr schwer kontrollierbar, und die Lösung dieses Problems durch entsprechende Sondenkonstruktion ist nur unter großem Aufwand denkbar. Ein weiterer Nachteil des TaqMan® ist die Erzeugung eines äquimolaren Signals, d.h., daß pro Amplifikationszyklus nur ein Sondenmolekül pro amplifiziertem 10 DNA Target-Molekül gespalten wird, was ein vergleichsweise schwaches Signal zur Folge hat.

Bei NASBA® handelt es sich - im Gegensatz zur thermozyklischen PCR - um eine homogene, isotherme *in vitro* Amplifikation (vgl. 15 z.B. T. Kievits et al, J. Vir. Meth. 35 (1991) 273-286), EP 0 329 822 sowie R. Sooknanan et al. in "Molecular Methods for Virus Detection", D.L. Wiedbrauk und D.H. Farkas (Ed.), Academic Press 1995, Kapitel 12, 261-285). Gegenüber anderen Amplifikationsverfahren weisen die NASBA® und andere isotherme Reaktionen den 20 Vorteil auf, daß sie ohne besonderen technischen Aufwand durchgeführt werden können, da die Amplifikation bei einem einzigen Temperaturwert erfolgt und diese Reaktionsbedingungen während des gesamten Prozesses beibehalten werden. Damit verkürzt nicht auch die Dauer jedes Amplifikationsschrittes. In Verbindung 25 mit der z.B. im Vergleich zur PCR hohen Amplifikationseffizienz werden so mit Hilfe der NASBA® und anderer isothermer Amplifikationstechniken hohe Amplifikat-Konzentrationen in kurzer Zeit erreicht. Ein weiterer Vorteil der NASBA® gegenüber der PCR ergibt sich aus der selektiven Nachweismöglichkeit von RNA. Dies 30 spielt insbesondere im Zusammenhang mit der Amplifikation bzw. Quantifizierung von zellulärer mRNA eine Rolle, bei der mögliche zelluläre DNA-Kontaminationen vermieden werden können.

Ein Nachteil der NASBA® und anderer isothermer Amplifikationsstrategien ist jedoch, daß eine Echtzeitdetektion mit Hilfe von Fluoreszenz wie bei dem auf PCR basierenden TaqMan® (Perkin Elmer) oder Light-Cycler (Roche Diagnostics) nicht möglich ist.

Die in diesem Zusammenhang vorgeschlagene Endpunktanalyse zur Quantifizierung ist mit Schwierigkeiten verbunden, da im Falle des Nachweises unterschiedlicher Target-RNA-Konzentrationen manche Proben bereits das Sättigungsniveau (Plateauphase) 5 erreicht haben können, während sich andere Proben noch in der Phase steigender Amplifikat-Konzentrationen befinden (vgl. auch Heid et al., a.a.O.). Ferner ist diese Endpunktanalyse aufgrund zusätzlicher Arbeitsschritte nach der erfolgten RNA-Amplifikation aufwendiger und zeitintensiver. Aufgrund des Erfordernisses, die 10 Reaktionsgefäße für die Quantifizierungsschritte zu öffnen, besteht außerdem das Risiko einer Kreuzkontamination hochamplifizierter RNA- und DNA-Targets.

Von Leone et al. (Nucleic Acids Research 26 (1998) 2150-2155) 15 wurde ein Ansatz zur Echtzeitdetektion von NASBA[®]-amplifizierter RNA vorgeschlagen, bei dem man eine zweifach fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde verwendet. Im Gegensatz zum PCR-Verfahren (vgl. Heid et al., a.a.O.) haftet die Sonde am Target an und wird bei der Amplifikationsreaktion nicht entfernt. Dies führt zu potentiellen 20 Komplikationen, da die DNA-Sonden während der frühen Amplifikationsstufen mit der Bindung an die ersten Antisense-RNA-Amplifikate interferieren können, was zum RNase H-Abbau und damit zu Eliminierung von RNA-Substraten und in der Folge zu einer fehlerhaften Konzentrationsbestimmung führen kann. Die Genauigkeit 25 der quantitativen Target-Bestimmung hängt ferner in entscheidendem Maß von der Menge der zugesetzten Sonde ab.

Das von Leone et al. vorgeschlagene System erlaubt allerdings nur eine sehr schlechte Quantifizierung, unabhängig davon, ob man die 30 bevorzugte Auswertung auf Basis des Schwellenwerts (vgl. Leone et al., Figur 7; Kurven für 100 fg und 1 pg überlappen zu Beginn) oder nach Erreichen des Plateaus (vgl. Leone et al., Figur 7; Kurven für 1 pg und 10 pg überlappen am Ende) durchführt.

35 Ferner ist nur eine sehr geringe Stringenz möglich, da die Sonde am Target haften bleibt und die isotherme Reaktion bei relativ geringer Temperatur (41° C) erfolgt, was ein hohes Risiko falsch

positiver Ergebnisse zur Folge hat. Offensichtlich könnte, abhängig von der Sonde, ein maximales Signal sogar bei geringeren Temperaturen erhalten werden (vgl. Leone et al., Figur 7), aber aufgrund der gewählten Versuchsdurchführung hätte dies ein 5 zusätzliches Risiko für falsch positive Resultate zur Folge. Wie im Rahmen weiterer Untersuchungen anhand des von Leone et al. vorgeschlagenen Protokolls festgestellt wurde, variiert die optimale Temperatur für die Hybridisierung des Fluoreszenzmarkers in Abhängigkeit von der Länge bzw. der Sequenz des hybridisierten Target-Abschnitts.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, insbesondere von RNA, zur Verfügung zu stellen, das die Nachteile der im Stand der 15 Technik bekannten Methoden, insbesondere des Verfahrens von Leone et al., vermeidet und für Routineanwendungen geeignet ist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5 gelöst.

20

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, bei dem man

25 a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man

30 b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{\text{rel.}}$ « nach folgender

5 Formel bestimmt:

$$c_{\text{rel.}} = t_p / t_{\text{Ref.}},$$

wobei

10 t_p der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

15 $t_{\text{Ref.}}$ der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

20 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, das aufgrund des über den Primer eingeführten bzw. an die Nukleinsäureamplifikate angehängten Sequenzmotivs A und des in der Sonde verwendeten Motivs B die Bildung eines Hammerkopf-Ribozyms ermöglicht, kommt es zur Spaltung der Sonde und damit zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals. Das erfindungsgemäße Prinzip ist schematisch in Fig. 1 (sowie Fig. 2 bis 16) dargestellt. Erfindungsgemäß ist es selbstverständlich möglich, Sequenzen auszunutzen, die anstelle des Hammerkopf-Ribozyms zur Ausbildung anderer, kleinerer Ribozyme (z.B. des "Hairpin-Ribozyms" oder des "Hepatitis Delta") geeignet sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders zur Quantifizierung von RNA, DNA oder RNA/DNA-Chimären (d.h. Ribo- und Desoxyribonukleotiden enthaltenden Nukleinsäuren), die als 35 "Target-Nukleinsäure" bezeichnet werden, wobei gegebenenfalls eine dem Verfahren vorgesetzte Aufschmelzung doppelsträngiger Nukleinsäuren zum Erhalt von Einzelsträngen erforderlich ist.

Bei den im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeigneten Amplifikationsverfahren handelt es sich vorzugsweise um um isotherme Amplifikationsverfahren wie NASBA®, Transcription Mediated Amplification (TMA; vgl. z.B. M. Hirose et al., J. Clin.

5 Microbiol. 36 (1998) 3122-6) oder Self-sustained Sequence Replication (3SR; vgl. E. Fahy et al. in PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991, 25-33) oder um cyclische Amplifikationsverfahren wie z.B. PCR.

10 Soweit hierin nichts anderes angegeben ist kann es sich bei den Nukleotiden A, C und G jeweils um Ribonukleotide (rNTP) oder Desoxyribonukleotide (dNTP) handeln. "N" kann für ein beliebiges Ribo- oder Desoxyribonukleotid stehen. Im Falle von RNA/DNA-Chimären (d.h. Oligonukleotiden, die sowohl Ribo- als auch Desoxyribonukleotide enthalten) sind die obligatorischen Ribonukleotide mit dem Präfix "r" versehen (d.h. rA, rC, rG) bzw. U. Die Sequenzmotive A und B der Sonden können somit entweder ausschließlich aus Ribonukleotiden (RNA-Sonde) bestehen oder RNA/DNA-Chimäre sein. Beim Motiv A ist es jedoch erforderlich,

15 daß am 3'-Ende in jedem Fall das Ribonukleotid Adenin (rA) eingesetzt wird (d.h. 5'-GAA(rA)-3'). Beim Motiv B (5'-CUGANGA-3') ist es erforderlich, daß Guanin als Ribonukleotid vorliegt und Adenin am 3'-Ende ebenfalls ein Ribonukleotid (rA) ist (d.h. 5'-CU(rG)AN(rG)(rA)-3'). U kann gegebenenfalls durch T ausge-

20 tauscht sein.

25

Unter "Fluoreszenz-Schwellenwert" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Fluoreszenz-Wert verstanden, der um den Faktor 5-10 über der unter vergleichbaren Bedingungen (d.h. Reaktionsmischung

30 ohne Target- oder Referenz-Nukleinsäure) gemessenen Hintergrundschwankung liegt.

Die Zeit t_p entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis soviele Amplifikate der

35 Target-Nukleinsäure gebildet sind, daß der Fluoreszent-Schwellenwert (Schwellenwert) erreicht ist.

Die Zeit $t_{\text{Ref.}}$ entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis ausgehend von einer Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration soviele Amplifizate gebildet sind, daß der Schwellenwert erreicht ist. Die Referenznukleinsäure sollte in ihrer Nukleinsäuresequenz nur geringfügig von der Target-Nukleinsäuresequenz abweichen, damit eine möglichst genaue Quantifizierung erreicht wird.

Um die Konzentration der Target-Nukleinsäure möglichst exakt bestimmen zu können mißt man vorzugsweise mehrere $t_{\text{Ref.}}$ -Werte für Referenz-Nukleinsäuren unterschiedlicher Konzentration, so daß der gemessene t_p -Wert möglichst zwischen zwei $t_{\text{Ref.}}$ -Meßpunkten liegt und somit eine bestimmte Konzentration zugeordnet werden kann. Vorzugsweise mißt man drei $t_{\text{Ref.}}$ -Werte für eine Referenz-Nukleinsäure bei drei unterschiedlichen Konzentrationen und ermittelt die sich daraus ergebende Meßkurve (Eichkurve). Die Target-Nukleinsäure unbekannter Konzentration kann anschließend durch Bestimmung des t_p -Wertes durch Vergleich mit der Eichkurve bestimmt werden.

20

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird das Verfahren durchgeführt, indem man die Target-Nukleinsäure in gleichzeitiger Anwesenheit einer oder mehrerer, vorzugsweise von drei Referenz-Nukleinsäuren bekannter Konzentration durchführt, 25 und zur Detektion verschiedene sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, die ein unterschiedliches Fluoreszenzsignal erzeugen. Die Sequenzen der Referenz-Nukleinsäuren in einem Amplifikationsansatz unterscheiden sich nur geringfügig voneinander und sollten Varianten der Target-Nukleinsäure sein. 30 Auf diese Weise können in einem Reaktionsansatz die t_p - und $t_{\text{Ref.}}$ -Werte gleichzeitig bestimmt und somit ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand die Konzentration ($c_{\text{rel.}}$) der Target-Nukleinsäure bestimmt werden (sogen. "Multiplexing"; vgl. auch US 5,837,501).

35 Anstelle der Verwendung eines das Sequenzmotiv A enthaltenen Primers und einer das Sequenzmotiv B enthaltenden Sonde ist auch die umgekehrte Kombination gleichermaßen geeignet, d.h. die

Kombination aus einem das Motiv B enthaltenden Primer und einer das Motiv A enthaltenden Sonde.

Als Reporter kommen praktisch alle Fluoreszenz-Farbstoffe und 5 insbesondere die in Tab. III angegebenen Farbstoffe (vor allem FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue (TIB MOLBIOL) in Frage. Vorzugsweise handelt es sich bei den Reporter-Farbstofen um Substanzen mit hohem Fluoreszenzsignal (d.h. hoher "Lichtausbeute") bei geringem 10 "Photobleaching".

Als Quencher können Farbstoffe eingesetzt werden, die bei Wellenlängen > ca. 500 nm absorbieren. Unter den in Frage kommenden Substanzen sind TAMRA, LCR, CY-5 oder DABCYL bevorzugt.

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Reporter/Quencher-Kombinationen bevorzugt, die eine Anregung bei ca. 490 nm und eine Emission bei < ca. 650 nm (TaqMan® SDS 7700, Perkin Elmer) oder < 700 (Light Cycler, Boehringer) gestatten. Die Fluoreszenz 20 kann praktisch mit jedem handelsüblichen Fluorimeter gemessen werden.

Beim Multiplexing bietet sich die Kombination des universellen Quenchers DABCYL mit Reporter-Farbstoffen wie Coumarin (emittierte 25 Fluoreszenz bei 475 nm), FAM (emittierte Fluoreszenz bei 515 nm), BODIPY (emittierte Fluoreszenz bei 525 nm), TAMRA (emittierte Fluoreszenz bei 575 nm), Texas Red (emittierte Fluoreszenz bei 615 nm), CY-5 (emittierte Fluoreszenz bei 674 nm) usw. an (vgl. z.B. S. Tyagi et al., Nature Biotech. 16 (1998) 49-53).

30 Sollte die zu amplifizierende Nukleinsäure bereits die Sequenzmotive 5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3' ("Ribozym-Motive") enthalten, kann das Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion erfindungsgemäß ebenfalls durchgeführt werden, 35 wobei - aufgrund des bereits in der Target-Nukleinsäure enthaltenen Ribozym-Motivs - unmarkierte Primer einzusetzt werden, d.h. Primer, an die Motiv A oder Motiv B nicht angehängt sind. Die

Detektion erfolgt schließlich, indem man die Nukleinsäure-Amplifikation - vorzugsweise NASBA®, TMA, 3SR oder PCR - in Gegenwart eines Überschusses einer Sonde durchführt, die das jeweils zum in der Target-Nukleinsäure enthaltenen Ribozym-Motiv 5 "komplementäre" Motiv enthält. Unter "komplementäres Motiv" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Motiv verstanden, das - abhängig von dem in der Target-RNA enthaltenen Ribozym-Motivs (5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3') zur Ausbildung einer Hammerkopf-Ribozym-Struktur (Hammerhead-Ribozym) erforderlich ist.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, bei dem man

15

a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der für das Motiv A im Transkript kodiert, amplifiziert wird, wobei man

20

b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

25

c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $C_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

30

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

t_p , der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$, der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist somit erstmals eine quantitative Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren (d.h. RNA, DNA oder RNA-DNA-Chimären) im Rahmen einer isothermen Nukleinsäureamplifikation, z.B. mittels NASBA®, TMA oder 3SR, möglich. Im Falle der NASBA® werden insbesondere die dem System von Leone et al. (a.a.O.) anhaftenden Probleme umgangen. Ferner kommt es nicht zu einer möglichen Konkurrenz zwischen Detektion und Amplifikation, da die Sonde - eine RNA-Substratsonde - nicht am Target haften bleibt sondern abgespalten und freigesetzt wird, wodurch ein nachweisbares Signal erzeugt wird. Ferner ist von Vorteil, daß RNase H die Target-RNA im Hybrid aus RNA-Substratsonde und RNA-Target nicht abbauen kann. Ferner ist die Menge der RNA-Substratsonde nicht kritisch, und sie kann in einem sehr hohen Überschuß, wie z.B. 500 nM gegenüber 2 nM Ribozym-Target oder 0,066 nM Ribozym, eingesetzt werden.

Gegenüber den auf der PCR-basierenden Echtzeitverfahren wie TaqMan® oder Light Cycler® weist das erfindungsgemäße Verfahren unter isothermen wie unter cyclischen Temperaturbedingungen (PCR) ebenfalls Vorteile auf. Aufgrund der Möglichkeit, im Rahmen eines Amplifikationsschrittes mehrere Sonden zu spalten, kann ein vergleichsweise höheres Signal generiert werden. Dieses führt zu einer höheren Sensitivität der Reaktion und zu einer verkürzten Reaktionszeit. Zudem ist die Signalgenerierung aufgrund der enzymatischen Spaltung grundsätzlich steuerbar. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens liegt in der hohen Spezifi-

tät der Reaktion, da nur eine exakte Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz zum Spaltungsprozeß und damit zum Entstehen eines signifikanten Signals führt. ferner ist insbesondere im Vergleich zum TaqMan® keine aufwendige Sondenkonstruktion notwendig, da sich die Sonde nach jedem Spaltungsprozeß von der Zielsequenz löst. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens besteht 5 in der Möglichkeit des Multiplexing

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt aufgrund der enzymatischen 10 Spaltung der Sonde eine sehr gute und exakte lineare Quantifizierung. Im erfindungsgemäßen Ribozym-System erzeugt die Hybridisierung selbst nur ein sehr schwaches Signal, während jedes in der amplifizierten Nukleinsäure vorhandene Ribozym eine Vielzahl von Nukleinsäure-Substratsonden spaltet. Diese weitere Amplifikation 15 ist sehr spezifisch und erfordert das Vorliegen einer vollständig hybridisierenden Sequenz (vgl. Singh et al., Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 6 (1996) 165-168). Ohne das Risiko, falsch positive Resultate zu erhalten, können Temperatur und sonstige Reaktionsbedingungen optimiert werden, um zu einem maximalen 20 Fluoreszenzsignal zu kommen. Beispielsweise können synthetische Peptide (vgl. Müller et al., J. Mol. Biol. 242 (1994) 422-429), CTAB (Nedbal et al., Biochemistry 36 (1997) 13552-7) oder GAP-DH (Sioud et al., J. Mol. Biol. 257 (1996) 775-789) zugesetzt werden, die die Effizienz, wie z.B. die Hybridisierungsgeschwin- 25 digkeit, und die Spezifität der Target-Erkennung erhöhen können.

Gegenüber den im Stand der Technik angewandten oder vorgeschlagenen Amplifikationsverfahren mit Target-Quantifizierung können durch die vorliegende Erfindung die Stabilität der RNA-Sonde 30 erhöht und deren Kosten gleichzeitig reduziert werden. So ist es z.B. möglich, nahezu alle, bei der chemischen Synthese teureren Ribonukleotide durch 2'-Desoxyribonukleotide zu ersetzen, die billiger und gegenüber Abbau (durch längerfristige Lagerung, Einwirkung von Nukleasen, Metallionen wie Magnesium, sowie Hitze 35 usw.; vgl. Bratty et al., Biochim. Biophys. Acta 1216 (1993) 345-359) stabiler sind.

Im Hinblick auf eine Verbesserung der allgemeinen Ribozym-Struktur und Effizienz des Verfahrens sind unter anderem folgende Modifikationen möglich:

5 Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, d.h. um mehr Signale bezogen auf die Anzahl amplifizierter Nukleinsäure-Moleküle zu erzeugen, sollte auf den Spaltungsort des Ribozyms die Sequenz UA folgen (vgl. Clouet-d'Orval et al., Biochemistry 36 (1997) 9087-9092). Ferner sollte die Position X (vgl. Figur 4B) die
10 modifizierte Base Pyridin-4-on (vgl. Burgin et al., Biochemistry 35 (1996) 14090-14097) enthalten, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der Detektionsstufe führt.

Durch das Ersetzen der meisten Ribonukleotide durch Desoxy-
15 ribonukleotide können die Kosten für eine RNA-Sonde um bis das 10fache gesenkt werden. An vier Positionen sind Ribonukleotide jedoch essentiell, die z.B. in Fig. 2B, 4B, 15 und 16 mit "r" gekennzeichnet sind (vgl. Byang et al., Biochemistry 31 (1992) 5005-5009). In den hierin vorhandenen Tabellen werden zur
20 Unterscheidung von Desoxy- und Ribonukleotiden ferner Großbuchstaben (für dNTPs) und Kleinbuchstaben (für rNTPs) verwendet.

Ferner hat sich gezeigt, daß chimäre DNA/RNA Hammerkopf-Ribozyme eine erhöhte katalytische Effizienz und Stabilität aufweisen
25 (N.R. Taylor et al., Nucleic Acids Research 20 (1992) 4559-4565). Dieses Prinzip kann man erfindungsgemäß insbesondere für Amplifikationsverfahren wie z.B. PCR ausnutzen, die bei höheren Temperaturen oder bei cyclischen Temperaturprofilen durchgeführt werden.

30

Zusätze wie z.B. das Protein GAP-DH (vgl. Sioud et al., J. Mol. Biol. 257 (1996) 775-789), kurze synthetische Peptide, die vom Viral coat protein (vgl. Müller et al., J. Mol. Biol. 242 (1994) 422-429) abgeleitet sind oder die chemische Substanz CTAB (Netbal et al., Biochemistry 36 (1997) 13552-13557) sind geeignet, die Effektivität des Verfahrens im Hinblick auf das Auffinden von in großen Nukleinsäure-Strukturen "versteckten" Targets, d.h.

Ribozym-Motiven, zu erhöhen.

Auf Basis der vorliegenden Erfindung ist es erstmals möglich, mehrere verschiedene Targets simultan durch Verwendung entsprechender Ribozym-Sonden mit unterschiedlichen Reporter-Farbstoffen nachzuweisen. Dabei sind Sequenz-spezifische Sonden erforderlich, die selektiv an den jeweils nachzuweisenden Target-Nukleinsäuren anhaften und bei Ribozym-Spaltung Fluoreszenz-Signale unterschiedlicher Wellenlänge erzeugen. Beispielsweise ist es möglich, den Quencher DABCYL mit Reporter-Farbstoffen, wie z.B. Cumarin (Fluoreszenzemission bei 475 nm), FAM (Fluoreszenzemission bei 515 nm), BODIPY (Fluoreszenzemission bei 525 nm), TAMRA (Fluoreszenzemission bei 575 nm), Texas red (615 nm), CY-5 (674 nm) usw., zu kombinieren (vgl. Tyagi et al., Nature Biotech. 16 (1998) 49-53). Mit diesem sogenannten "Multiplexing" ist es somit möglich, innerhalb eines Reaktionsansatzes gleichzeitig eine Target-RNA sowie mehrere Referenzproben bekannter Konzentration, deren Sequenzen sich im Primer-bindenden Abschnitt jeweils geringfügig voneinander unterscheiden, zu amplifizieren, wobei durch Sequenz-spezifische Sonden, die unterschiedliche Reporter/Quencher-Kombinationen tragen, eine Quantifizierung erfolgen kann, ohne daß getrennte Amplifikationen und Fluoreszenzmessungen mit den RNA-Referenzproben durchgeführt werden müssen.

25

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung der oben genannten Verfahren, der entweder

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (oder 5'-CUGANGA-3') im Transkript kodiert,
- b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
- c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikationsreaktion,
- d) eine Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50

Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls

5 e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt,

oder

10 a) zwei Amplifikationsprimer,
b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
c) eine Nukleinsäure-Sonde vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
15 d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

20

umfaßt.

Gemäß einem Teilaспект der vorliegenden Erfindung werden erstmals ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren sowie Kits zur 25 Durchführung des Verfahrens zur Verfügung gestellt.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man 30 eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide) in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter- 35 Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweisen muß und man die Nukleinsäure durch

Erhalt eines der Wahl der Reporter- und Quencher-Moleküle entsprechendes Fluoreszenzsignals nachweist.

Ein erfindungsgemäßer Kit zur Durchführung dieses Nachweisverfahrens umfaßt neben zur Durchführung der Reaktion erforderlichen Lösungsmittel und Reagenzien eine Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül (s.o.) angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

Für den Fall, daß die Target-Nukleinsäuren keines der Sequenzmotive A oder B enthalten, kann die Nukleinsäure nachgewiesen werden, indem eines der Motive z.B. durch Nukleinsäureamplifikation unter Verwendung eines oben genannten Primers eingeführt wird. Zur Detektion ist eine entsprechende doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde (s.o.) erforderlich, die ein zur Ribozym-Bildung geeignetes Sequenzmotiv enthält.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits wird - mit oder ohne Einsatz einer Nukleinsäure-Amplifikation - eine neue Methode zum Erreger-Nachweis zur Verfügung gestellt. Wie im folgenden angegeben enthält beispielsweise die 16S rRNA vieler Erreger-Spezies bereits natürlicherweise ein 5'-GAAA-3' Ribozym-Motiv, das zur Bildung des Hammerkopf-Ribozyms ausgenutzt werden kann. Falls die Nukleinsäuren der Erreger keine zur Ausbildung von Ribozymen geeignete Sequenzmotive enthalten können diese, wie oben angegeben, im Rahmen der Amplifikationsstufen durch Verwendung entsprechender Primer eingeführt bzw. "addiert" werden.

- 16 -

Tab. I: GAAA in 16S rRNA

Region in E.coli 16S rRNA	70-100	115-145
E. coli	---	taatgtctggGAAActgcctgatg
Salmonella	---	taatgtctggGAAActgcctgatg
Staphylococcus	---	---
C. perfringens	tttccttcggGAAAcggattagcg	---
Vibrio	aagtgcagcgGAAAcgagttatct	taatgccttagGAAAttgcctgat
B.cereus	---	---
C. botulinum	---	---
Campylobacter	---	---
Yersinia	---	taatgtctggGAAActgcctgatg
Listeria	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	145-175	180-210
E. coli	ataactactgGAAAcggtagctaa	---
Salmonella	ataactactgGAAAcggtagctaa	---
Staphylococcus	ataacttcggGAAAcggagctaa	gttcaaaaagtGAAAGacggcttg
C. perfringens	atagccttccGAAAGgaagattaa	tcataatgttGAAAGatggcatca
Vibrio	ataaccatgtGAAAcgatggctaa	---
B. cereus	ataactccggGAAAccggggctaa	cgcatggttcGAAAttGAAAgcgc
C. botulinum	atagccttccGAAAGgaagattaa	---
Campylobacter	acaacagttgGAAAcgactgctaa	gttgagtaggGAAAGttttcggt
Yersinia	ataactactgGAAAcggtagctaa	---
Listeria	ataactccggGAAAccggggctaa	ccacgctttGAAAGatggttcg

Region in E. coli 16S rRNA	370-400	485-515
E. coli	---	---
Salmonella	---	---
Staphylococcus	cgttaatggggGAAAcctgacgga	tacctaatcaGAAAGccacggcta
C. perfringens	agggtcattgGAAActgGAAAact	---
Vibrio	---	---
B. cereus	cgcataatggacGAAAGtctgacgga	taccttaaccaGAAAGccacggcta
C. botulinum	cgcataatggggGAAAccctgacgca	---
Campylobacter	cgcataatggggGAAAccctgacgca	---
Yersinia	---	---
Listeria	cgcataatggacGAAAGtctgacgga	tatctaaccaGAAAGccacggcta

Region in E. coli 16S rRNA	595-625	625-655
E. coli	agtcaagatgtGAAAAtccccggct	---
Salmonella	agtccggatgtGAAAAtccccggct	aactgcatttcGAAActggcaggct
Staphylococcus	agtctgatgtGAAAAGcccacggct	agggtcatttgGAAAActgGAAAact
C. perfringens	agtggatgtGAAAAtccccggct	---
Vibrio	agtcaagatgtGAAAAGccccggct	nattgcatttGAAAActggcagact
B. cereus	agtctgatgtGAAAAGcccacggct	agggtcatttgGAAActggagact
C. botulinum	agtggatgtGAAAAtccccggct	---
Campylobacter	agtcttttgtGAAAAtcttaatggct	aactgcatttgGAAAActgtatagtct
Yersinia	cagtcaagatgtGAAAAtccccggct	aactgcatttGAAAActggcaagct
Listeria	agtctgatgtGAAAAGccccggct	agggtcatttgGAAAActggaaagact

Region in E. coli 16S rRNA	650-680	660-690
E. coli	---	---
Salmonella	---	---
Staphylococcus	tgcGAAActgGAAAacttttgtgc	tgcagaagagGAAAActggattcc
C. perfringens	---	---
Vibrio	---	---
B. cereus	---	tgcagaagagGAAAActggattcc
C. botulinum	---	tgcaggagagGAAAAGcggattcc
Campylobacter	---	---
Yersinia	---	---
Listeria	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	685-715	755-780
E. coli	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagaga	gctcagggtgcGAAAAGcgtggggag
Salmonella	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagaga	gctcagggtgcGAAAAGcgtggggag
Staphylococcus	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagaga	gctgatgtgcGAAAAGcgtggggat
C. perfringens	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagaga	gctgaggctcGAAAAGcgtggggag
Vibrio	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagaga	---
B. cereus	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagaga	actgaggcgcGAAAAGcgtggggag
C. botulinum	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagaga	gctgaggcacGAAAAGcgtgggttag
Campylobacter	---	gctaaggcgcGAAAAGcgtggggag
Yersinia	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagaga	gctcagggtgcGAAAAGcgtggggag
Listeria	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagata	gctgaggcgcGAAAAGcgtggggag

Region in E. coli 16S rRNA	895-925	1000-1050
E. coli	---	---
Salmonella	---	---
Staphylococcus	ccgcaagggtt GAAActcaaaggaa	---
C. perfringens	---	cttaatcgagGAAAttccttCgggtt
Vibrio	---	---
B. cereus	ccgcaaggct GAAActcaaaggaa	---
C. botulinum	---	---
Campylobacter	---	---
Yersinia	---	---
Listeria	ccgcaagggtt GAAActcaaaggaa	---

Region in E. coli 16S rRNA	1065-1095	1245-1275
E. coli	ctcggttgttGAAAatgttgggtta	---
Salmonella	ctcggttgttGAAAatgtcggttta	---
Staphylococcus	---	aaaggccagcGAAActcgaggttc
C. perfringens	---	---
Vibrio	ctcggttgttGAAAatgttgggtta	gccaaacttgcGAAAtcgagcgaat
B. cereus	---	---
C. botulinum	---	---
Campylobacter	---	---
Yersinia	ctcggttgttGAAAatgttgggtta	---
Listeria	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	1305-1335
E. coli	---
Salmonella	---
Staphylococcus	---
C. perfringens	attgttaggttGAAActcgccata
Vibrio	---
B. cereus	---
C. botulinum	---
Campylobacter	---
Yersinia	---
Listeria	---

- 19 -

Tab. II: GAAA in 16S rRNA

Region in E. coli 16S rRNA	70-100	115-145
S. aureus	---	---
S. epidermidis	---	---
S. pneumoniae	---	---
S. pyogenes	---	---
E. faecalis	cactcaatttGAAAGaggagtggc	---
N. meningitidis	---	---
E. coli	---	taatgtctggGAAActgcctgatg
Enterobacter spec.	---	taatgtctggGAAActgccatgg
Proteus spec.	---	ggtaacaggaGAAAgcttgctttc
P. aeruginosa	---	---
P. fluorescens	---	---
P. mendocina	---	---
P. syringae	---	---
H. influenzae	---	ggtagcaggaGAAAgcttgctttc
H. ducreyi	---	---
Bacteroides spec.	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	145-175	180-210
S. aureus	ataaacttcggGAAACcgaggactaa	gttcaaaagtGAAAGacggttttg
S. epidermidis	ataaacttcggGAAACcgaggactaa	gttcaatagtGAAAGacggttttg
S. pneumoniae	ataactatttGAAACgtatagctaa	---
S. pyogenes	ataactatttGAAACgtatagctaa	---
E. faecalis	ataaacacttgGAAACaggtgtctaa	gcataagagtGAAAGgcgcctttcg
N. meningitidis	ataactgtatcGAAAGatcagctaa	tcttgagagaGAAAGcaggggacc
E. coli	ataactactgGAAACggtagctaa	---
Enterobacter spec.	ataactactgGAAACggtagctaa	---
Proteus spec.	ataactactgGAAACgggtggctaa	---
P. aeruginosa	ataacgtccgGAAACggccgctaa	tcctgaggggaGAAAGtcggggatc
P. fluorescens	ataacgttcgGAAACggacgctaa	tcctacgggaGAAAGcaggggacc
P. mendocina	ataacgttccGAAAGgaacgctaa	tcctacgggaGAAAGcangggacc
P. syringae	ataacgtctcgGAAACggacgctaa	tcctacgggaGAAAGcaggggacc
H. influenzae	ataactactgGAAACggtagctaa	taaagggggcGAAAGctgttgcctaa
H. ducreyi	ataactacggGAAActgttagctaa	---
Bacteroides spec.	atagcctttcGAAAGAAAGatctaa	---

Region in E. coli 16S rRNA	370-400	450-480
S. aureus	cgcaatgggcGAAA Agcctgacgga	---
S. epidermidis	cgcaatgggcGAAA Agcctgacgga	---
S. pneumoniae	---	tgtgag atgtg GAA Agtt cacactg
S. pyogenes	---	gg tgg gat tg GAA Aatcc cacca ng
E. faecalis	cgcaatggacGAAA gttgcaccpa	---
N. meningitidis	---	tgtcagg gas GAA Aaggctttgc
E. coli	---	---
Enterobacter spec.	---	---
Proteus spec.	---	---
P. aeruginosa	---	---
P. fluorescens	gacaatgggcGAAA Agcctgatcca	---
P. mendocina	gacaatgggcGAAA Agcctnatcca	---
P. syringae	gacaatgggcGAAA Agcctgatcca	---
H. influenzae	cgcaatggggGAAA Accctgatgca	---
H. ducreyi	cacaatggggGAAA Accctgatgca	---
Bacteroides spec.	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	485-515	595-625
S. aureus	taccta atca GAAA Agccacggcta	agtctgat gt GAAA Agcccacggct
S. epidermidis	taccta atca GAAA Agccacggcta	agtctgat gt GAAA Agcccacggct
S. pneumoniae	tatctta ccca GAAA Agggacggcta	---
S. pyogenes	taacta acca GAAA Agggacggcta	---
E. faecalis	tatcta acca GAAA Agccacggcta	agtctgat gt GAAA Agccccggct
N. meningitidis	---	agcaggat gt GAAA Atccccggct
E. coli	---	agt cag at gt GAAA Atccccggct
Enterobacter spec.	---	aagt cgt at gt GAAA Atccccggct
Proteus spec.	---	agt cag at gt GAAA Agccccgagct
P. aeruginosa	---	agctt gt at gt GAAA Atccccggct
P. fluorescens	---	agttggat gt GAAA Atccccggct
P. mendocina	---	agttggat gt GAAA Agccccggct
P. syringae	---	agttgaat gt GAAA Atccccggct
H. influenzae	---	agt gagg at gt GAAA Agccctggct
H. ducreyi	---	agt gagg at gt GAAA Agccccggct
Bacteroides spec.	---	agt cagt tt gt GAAA gttgcggct

Region in E. coli 16S rRNA	625-655	650-680
S. aureus	agggtcattgGAAAActgGAAAact	tttGAAAActgGAAAacttgagtgc
S. epidermidis	agggtcattgGAAAActgGAAAact	tttGAAAActgGAAAacttgagtgc
S. pneumoniae	ggggcttttGAAAActgttttact	---
S. pyogenes	gtacgctttGAAAActggagaact	---
E. faecalis	agggtcattgGAAAActggagact	---
N. meningitidis	---	---
E. coli	---	---
Enterobacter spec.	aactgcatttGAAAActggagatt	---
Proteus spec.	aactgcatttGAAAActggctggct	---
P.aeruginosa	---	---
P. fluorescens	---	---
P. mendocina	---	---
P. syringae	---	---
H. influenzae	---	---
H.ducreyi	---	---
Bacteroides spec.	atttggatttGAAAActggccatcc	---

Region in E. coli 16S rRNA	660-690	685-715
S. aureus	tgcagaagagGAAAgtggattcc	gtgttagcggtGAAAAtgcgcagaga
S. epidermidis	tgcagaagagGAAAgtggattcc	gtgttagcggtGAAAAtgcgcagaga
S. pneumoniae	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
S. pyogenes	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
E. faecalis	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
N. meningitidis	---	gtgttagcagtGAAAAtgcgtagata
E. coli	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
Enterobacter spec.	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
Proteus spec.	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
P.aeruginosa	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
P. fluorescens	---	gtgttagygggtGAAAAtgcgtgtata
P. mendocina	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
P. syringae	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
H. influenzae	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
H.ducreyi	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgtagata
Bacteroides spec.	---	gtgttagcggtGAAAAtgcgttagata

Region in E. coli 16S rRNA	715-745	755-780
S. aureus	---	gctgatgtgcGAAA Agcgtggggat
S. epidermidis	---	gctgatgtgcGAAA Agcgtggggat
S. pneumoniae	caccgggtggcGAAA Agcggctctct	gctgaggctcGAAA Agcgtggggag
S. pyogenes	caccgggtggcGAAA Agcggctctct	gctgaggctcGAAA Agcgtggggag
E. faecalis	---	gctgaggctcGAAA Agcgtggggag
N. meningitidis	---	gttcatgcccGAAA Agcgtgggtat
E. coli	---	gctcaggtgcGAAA Agcgtggggag
Enterobacter spec.	---	gctcaggtgcGAAA Agcgtggggag
Proteus spec.	---	gctcaggtgcGAAA Agcgtggggac
P.aeruginosa	---	actgaggtgcGAAA Agcgtggggag
P. fluorescens	---	actgaggtgcGAAA Agcgtggggag
P. mendocina	---	actgaggtgcGAAA Agcgtggggag
P. syringae	---	actgaggtgcGAAA Agcgtggggag
H. influenzae	---	gctcatgtgtGAAA Agcgtggggag
H.ducreyi	---	gctcatgtgcGAAA Agcgtggggag
Bacteroides spec.	---	actgatgctcGAAA Agcgtgtggtat

Region in E. coli 16S rRNA	845-875	895-925
S. aureus	---	ccgcaagg t tGAAA Actcaaaggaa
S. epidermidis	---	ccgcaagg t tGAAA Actcaaaggaa
S. pneumoniae	---	ccgcaagg t tGAAA Actcaaaggaa
S. pyogenes	---	ccgcaagg t tGAAA Actcaaaggaa
E. faecalis	---	ccgcaagg t tGAAA Actcaaaggaa
N. meningitidis	gctaacggptGAAA Attgaccgcct	---
E. coli	---	---
Enterobacter spec.	---	---
Proteus spec.	---	---
P.aeruginosa	---	---
P. fluorescens	---	---
P. mendocina	---	---
P. syringae	---	---
H. influenzae	---	---
H.ducreyi	---	---
Bacteroides spec.	---	cggea a agg t GAAA Actcaaaggaa

Region in E. coli 16S rRNA	1065-1095	1245-1275
S. aureus	---	aaagggcagc GAAAccgcgaggtc
S. epidermidis	---	aaagggtagc GAAAccgcgaggtc
S. pneumoniae	---	---
S. pyogenes	---	---
E. faecalis	---	---
N. meningitidis	---	---
E. coli	ctcggttgt GAAA tgttgggtta	---
Enterobacter spec.	ctcggttgt GAAA tgttgggtta	---
Proteus spec.	tcgttgttg GAAA tgttgggtta	---
P. aeruginosa	---	---
P. fluorescens	---	---
P. mendocina	---	---
P. syringae	---	---
H. influenzae	ctcggttgt GAAA tgttgggttn	gcgaatccca GAAA gtgcacatctaa
H. ducreyi	ctcggttgt GAAA tgttgggttn	---
Bacteroides spec.	---	---

Region in E. coli 16S rRNA	1400-1430
S. aureus	---
S. epidermidis	---
S. pneumoniae	---
S. pyogenes	---
E. faecalis	---
N. meningitidis	---
E. coli	----
Enterobacter spec.	----
Proteus spec.	----
P. aeruginosa	----
P. fluorescens	----
P. mendocina	----
P. syringae	----
H. influenzae	----
H. ducreyi	----
Bacteroides spec.	gaataacgtg GAAA catttttagcc

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen und Figuren näher erläutert.

Beschreibung der Figuren:

5

Fig. 1: Allgemeines Schema der NASBA® kombiniert mit Ribozymen zur Echtzeitdetektion.

Ribozym-Motiv innerhalb eines der zwei Primer. Es ist nur eine Möglichkeit gezeigt, bei der sich das Ribozym-Motiv am 3'-Ende 10 der amplifizierten RNA befindet. Die RNA Substrat-Sonde ist mit einem Fluorezenzfarbstoffen markiert, dem Reporter (Kreis) und einem Quencher (Dreieck). In der intakten Sonde führt die effiziente Wechselwirkung beider Labels zum "FRET" or Quenching, d.h. zu keinem (or nur sehr schwachem) Reporter-Signal (leerer 15 Kreis). Das Ribozym spaltet viele Sonden-Moleküle. In der gespaltenen Sonde werden beide Labels getrennt, und es wird ein starkes Reporter-Signal erzeugt (gefüllte Kreise).

Fig. 2: A: Allgemeine Struktur von Hammerkopf-Ribozymen. Es sind 20 nur konservierte Nukleotide mit entsprechenden Buchstaben bezeichnet, alle nicht-konservierten Positionen sind mit N angegeben. Die Länge der hybridisierenden Arme können den jeweiligen Erfordernissen angepaßt werden. Drei Orte möglicher Hairpin-Schleifen sind durch gepunktete Linien dargestellt. Die 25 Polarität (5'-3' Richtung) ist nur für den gespaltenen Abschnitt angegeben. B: Entspricht Fig. 2A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.

30

Fig. 3: Eine Möglichkeit zur Aufspaltung eines minimalen Ribozyme und einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv wurde auf GAAA verkürzt.

35

Fig. 4: A: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher (einige wenige Möglichkeiten sind unten angegeben) an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden. B: Entspricht Fig. 4A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.

10

Fig. 5: Eine weitere Möglichkeit zur Aufspaltung einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv ist auf CUGA-N-GA reduziert.

15

Fig. 6: Basierend auf der in Fig. 5 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden (vgl. Fig. 4).

20

Fig. 7: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge des Basenpaar-bildenden Strokes kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 8: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Strokes kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 9: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung, gefolgt von einem sehr kurzen 3'-terminalen basenpaararten Abschnitt. Wie gezeigt ist, kann dieser Abschnitt mit dem 5 Ribozym-Motiv überlappen, und die Ausbuchtung kann so kurz sein, daß sie nur ein Nukleotid umfaßt. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaarbildenden Strokes kann variieren. Die resultierende amplifizierte 10 Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 10: Basierend auf der in Fig. 2B dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung 15 gefolgt von einer einzigen rA-T Basenpaarung mit der Target-Sequenz. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Strokes kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit 20 dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 11: Entspricht der in Fig. 10 dargestellten Möglichkeit. Hier enthält die Target-Sequenz jedoch bereits einen längeren 25 Stretch des Ribozym-Motivs (oder, wie gezeigt, des vollständigen Motivs).

Fig. 12: Beispielhafte Struktur eines DNAzyms (= katalytische DNA). Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rA vorhanden sein.

30

Fig. 13: Beispielhafte Struktur eines weiteren DNAzym. Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rRrY vorhanden sein.

- 27 -

Fig. 14: Entspricht Fig. 10, wobei der Primer den überwiegenden Teil des NAzym-Motivs (des katalytischen Nukleinsäure-Motivs) enthält und nur die zwei letzten Nukleotide fehlen. Gezeigt ist hier eine Möglichkeit basierend auf "Prototyp A". Für "Prototyp 5 B" ermöglicht das Vorliegen längerer Motive (z.B. TCGTTG statt TCGT) ein deletierteres Motiv im Primer einzusetzen, wobei das 3'-terminale ACGA im elongierten Primer durch die Target-Sequenz geliefert wird.

10 Fig. 15: Beispiel für eine universelle Ribozym-Sonde.

Fig. 16: Beispiel für eine HIV Ribozym-Sonde.

15

BEISPIELE

20 Material:

Die im Rahmen der Erfindung eingesetzten Primer und Sonden sind auf dem Fachmann geläufigem Wege erhältlich, wie z.B. durch Oligonukleotidsynthese.

25

Beispiel 1

NASBA®-Reaktion in Kombination mit Ribozym-abhängiger Detektion:

30

Alle Enzyme waren kommerziell von Pharmacia erhältlich, ausgenommen AMV-Reverse Transkriptase, die von Seikagaku bezogen wurde.

35 23µl NASBA® Reaktionsmischung, davon 5 µl aus der Aufreinigung nach Boom et al. (J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 495-503) (finale

- 28 -

Konzentration in 25 µl Reaktionsmischung: 40 mM Tris, pH 8,5, 12 mM MgCl₂, 42 mM KCl, 15 % v/v DMSO, 1 mM jedes dNTP, 2 mM jedes NTP, 0,2 µM Primer 1, 0,2 µM Primer 2 und 0,1-0,5 µM Substrat-Sonde) wurden bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert um eine Destabilisation der Sekundärstrukturen in der RNA zu ermöglichen. Anschließend wurde für das Primer-Annealing auf 41 °C abgekühlt. Die Amplifikation wurde durch Zugabe von 2 µl Enzym-Mischung (0,1 µg/µl BSA, 0,1 Einheiten RNase H, 40 Einheiten T7 RNA Polymerase und 8 Einheiten AMV Reverse Transkriptase) gestartet. Die Reaktion wurde bei 41 °C für 90 Minuten inkubiert. Während der Reaktion wurden die Fluoreszenzsignale im ABI Prism 7700 Sequence Detector gemessen. Als Reporter/Quencher wurde die Kombination FAM/TAMRA eingesetzt.

15 Experiment A:

(dNTP = Großbuchstaben; rNTP = Kleinbuchstaben)

Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT CAC
20 TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'

Primer 2: 5'-GAA TCT CAT CAG TAG CGA GTG GGG GGA CAT CAA GCA
GCC ATG CAA A-3'

25 Substrat A: 5'-TAMRA-Tga auc gaa acg cga aag cgu cua gcg u-FAM-3'

Experiment B:

30 Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT CAC
TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'

Primer 2: 5'-ACG TAG TTT CGG CCT TTC GGC CTC ATC AGC GTG CAG
TGG GGG GAC ATC AAG CAG CCA TGC AAA-3'

35

Substrat B: 5'-TAMRA-Tac gua guc cgu gcu-FAM-3'

Quantifizierung:

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe
5 Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen,
in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der
Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der
Standards betrug:

10 Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)
Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)
Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)
Q4 ca. 1 000 Moleküle (RNA)

15 Die Experimente A und B führten zu folgendem Ergebnis: Die im ABI
PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm
entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu.
Es zeigte sich, daß nach $t = 15$ Minuten bei der höchsten
eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein
20 definiert positives Signal erreicht wurde ($5 \times$ Std.dev. des
Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach $t = 20$, 24
und 26 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten
Proben erreichten nach ca. $t = 18$ und $t = 23$ Minuten ihren
Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten
25 Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge
von ca. 200 000 ($t = 18$) bzw. 15 000 ($t = 23$). Die Negativkon-
trollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine
Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene
Technik möglich ist.

30

Beispiel 2

Universelle Erkennung beliebiger (full-size) amplifizierter RNA-
35 Targets (ribozyme motive in reverse primer). Die entsprechende
"Universelle Ribozym-Sonde" wurde dem NASBA®-Amplifikationskit

zugesetzt.

An seinem 3'-Ende enthält der reverse Primer die übliche Target-specifiche Sequenz (N) und zusätzlich an seinem 5'-Ende eine Sequenz, die für das allgemeine universelle Ribozym-Motiv codiert:
5 5'-GCG TTT CGA TTC CNN NNN N...

Das Transcript endet mit der Sequenz
5'-. . . N NNN NNG GAA UCG AAA CGC

10 Die Ribozym-Sonde wies folgende Sequenz auf:
5'-GCG UC - U AGC GGA AAC GCU ACU GAX GAG AUU CC (32-mer)
- Spaltungsart

15 Zwei Farbstoffe, 5'-Q and 3'-R (oder 3'-Q und 5'-R) waren mit den Enden verknüpft.

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen,
20 in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)
25 Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)
Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)
Q4 ca. 1 000 Moleküle (RNA)

Das Experiment in Beispiel 2 führte zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach $t = 12$ Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein definiert positives Signal erreicht wurde ($5 \times \text{Std.dev.}$ des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach $t = 18$, 35 22 und 25 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekann-

ten Proben erreichten nach ca. $t = 18$ und $t = 23$ Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 100 000 ($t = 18$) bzw. 8000 ($t = 23$). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

Diese Beispiel-Sonde kann an einem oder beiden Enden durch mehr
10 Basen-gepaarte Nukleotide verlängert sein.

Beispiel 3

15 Spezifische Erkennung einer amplifizierten Target Sequenz:
proximal zu einem der Primer.

Das vorliegende spezifische Beispiele anhand einer NASBA®-
gestützten Detektion von HIV (entspr. USP 5,837,501) durch-
20 geführt.

Amplifiziertes Segment der HIV-RNA:

agtqqqqqgacatcaaqcaqctatqcaa(c,t)gttaaaagatactatcaatgaggaagc-
25 tgcagaatggacagggtacatccagtacatgcagggcattccaccaggccagatqaga-
gaacccaqqqqaqtqacataqca

(es ist nur ein Strang gezeigt, die Primer-Sequenzen sind unterstrichen). Die proximale Sequenz ist ebenfalls hoch
30 konserviert und schließt den folgenden Abschnitt ein:

aqcaqctatqGaaa(c,t)gttaaaaga

Der Vorwärtsprimer zur Einführung der T7 Promotor-Sequenz
(Großbuchstaben) and 1 Punktmutation (fettgedruckter Großbuch-
35 stabe):

AATTCTAATACGACTCACTATAAGGGagtqqqqqgacatcaaqcaqctatqGaaa

Das Transkriptionsprodukt enthält das GAAA Ribozym-Motiv, das mit der proximalen HIV-spezifischen Sequenz verknüpft ist:

GGGagcaqctatqGaaa(c,t) gttaaaaga....

5 Es kann insbesondere mit der komplementären Ribozym-Sonde, entsprechend dem allgemeinen Versuchsprotokoll durchgeführt werden.

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe
10 Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

15 Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)
Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)
Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)
Q4 ca. 1 000 Moleküle (RNA)

20 Das Experiment in Beispiel 3 führte zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach $t = 22$ Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert
25 für ein definiert positives Signal erreicht wurde ($5 \times \text{Std.dev.}$ des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach $t = 24$, 28 und 33 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca. $t = 18$ und $t = 23$ Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten
30 Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 400 000 ($t = 23$) bzw. 10 000 ($t = 28$). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

Beispiel 4

A. GAAA in rRNA-Abschnitten zur spezifischen Detektion von Bakterien-Spezies.

5

In den obigen Tabellen sind die wichtigsten, durch Lebensmittel übertragene Pathogene aufgeführt.

Einzigartige Sequenzmotive (schattiert) liegen zwischen den 10 Positionen 110 and 700 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor. Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind bekannt: 110f and 700r [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. (New York: Willey), pp. 115-175].

15

B. Spezifischen Detektion von Sepsis-Erregern.

In den obigen Tabellen sind ferner die wichtigsten Sepsis-Erreger 20 aufgeführt.

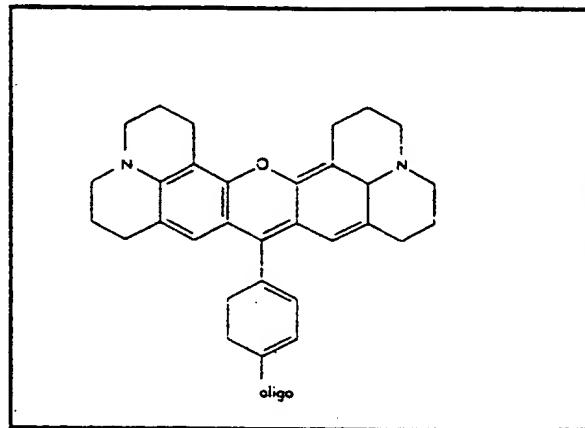
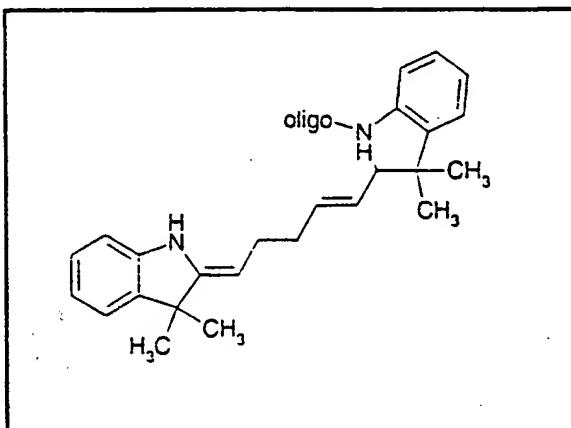
Einzigartige Sequenzmotive (schattiert), die erfindungsgemäß ausgenutzt werden können liegen zwischen den Positionen 110 and 530 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor.

25 Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind bekannt: [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. (New York: Willey), pp. 115-175].

30 Die in der 16S rRNA enthaltenen Sequenzmotive können für die erfindungsgemäßen Verfahren ausgenutzt werden, so daß im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verfahren zum Nachweis von Erregern, insbesondere von Sepsis-Erregern und Lebensmittelkeimen, und dafür vorgesehene Kits zur Verfügung gestellt werden.

35

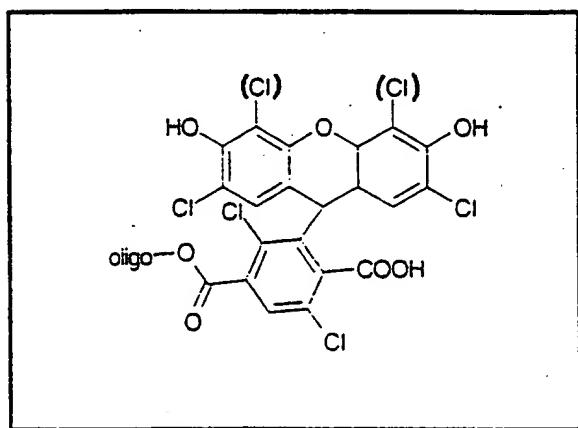
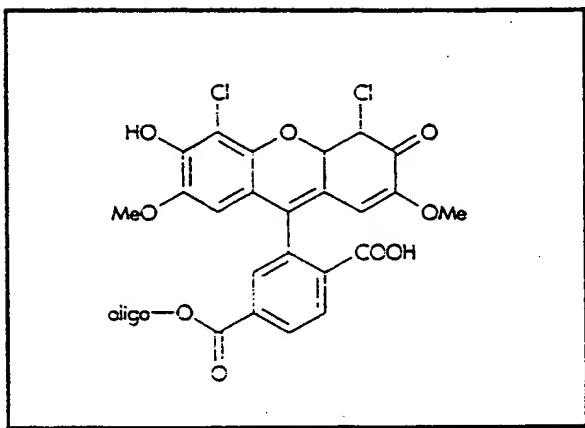
Tab. III: Als Reporter/Quencher geeignete Farbstoffe



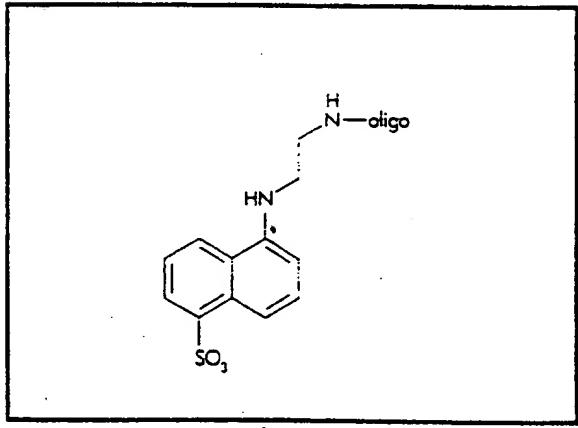
CY5

 $\lambda_{\text{max},A}: 651 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 674 \text{ nm}$

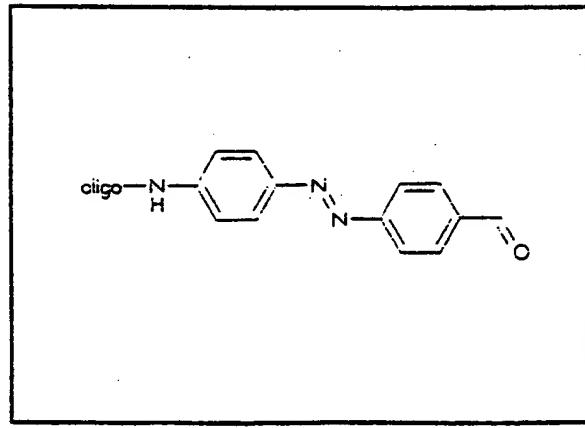
Texas Red

 $\lambda_{\text{max},A}: 583 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 603 \text{ nm}$  $[\text{Cl}_6]: \text{ HEX } \lambda_{\text{max},A}: 535 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 556 \text{ nm}$ $[\text{Cl}_4]: \text{ TET } \lambda_{\text{max},A}: 521 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 536 \text{ nm}$ 

JOE

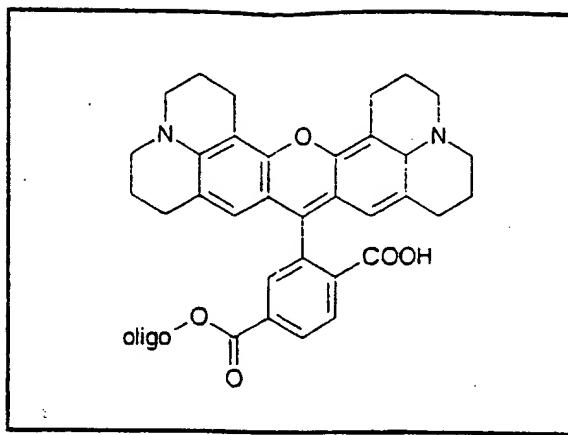
 $\lambda_{\text{max},A}: 527 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 548 \text{ nm}$ 

edans

 $\lambda_{\text{max},A}: 336 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 490 \text{ nm}$ 

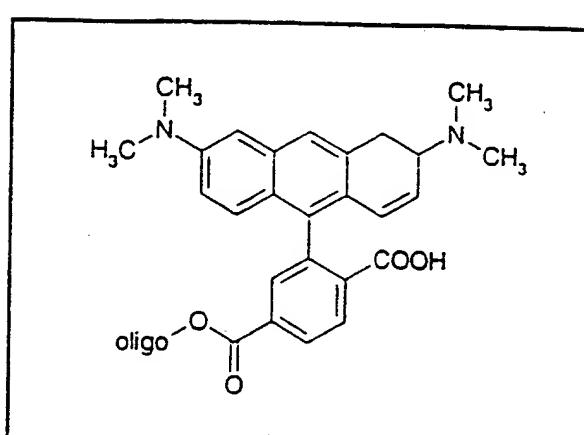
dabcyl

 $\lambda_{\text{max},A}: 453 \text{ nm}$



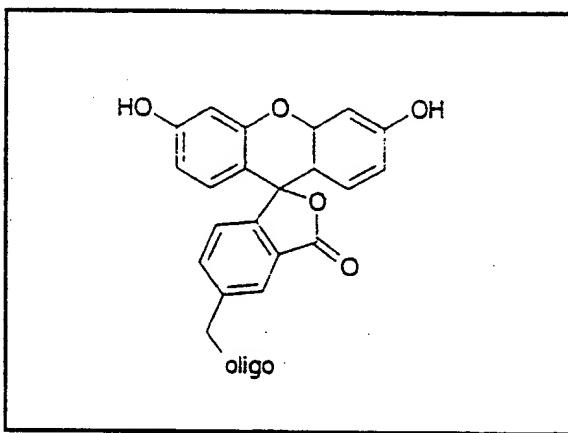
ROX (6-ROX)

ROX: $\lambda_{\text{max},A}: 568 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 595 \text{ nm}$
 6-ROX: $\lambda_{\text{max},A}: 575 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 602 \text{ nm}$



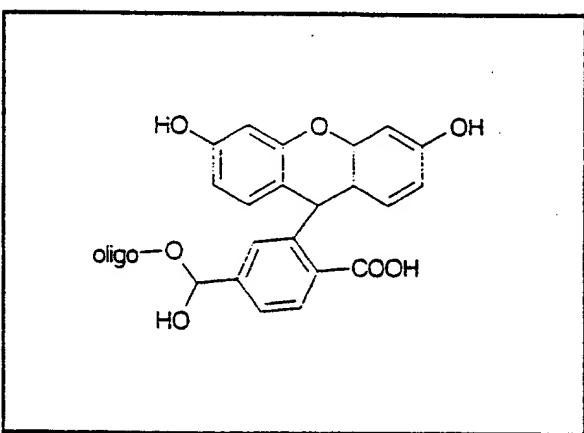
TAMRA

$\lambda_{\text{max},A}: 555 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 580 \text{ nm}$



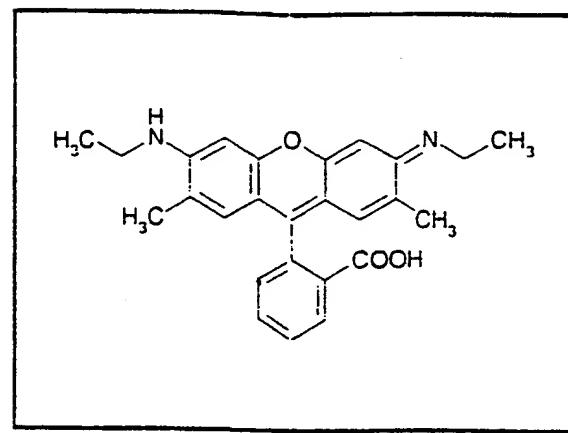
Fluorescein

$\lambda_{\text{max},A}: 494 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 525 \text{ nm}$



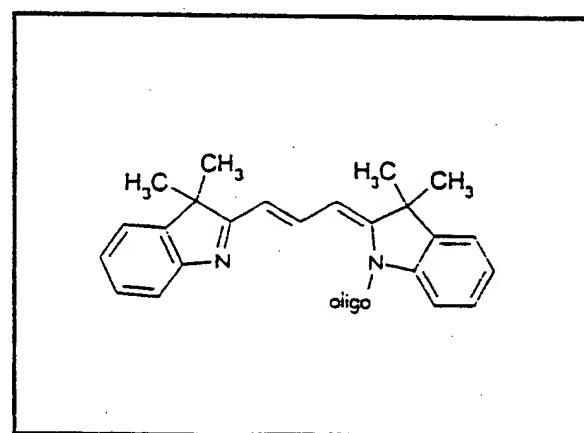
6 - FAM

$\lambda_{\text{max},A}: 492 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 515 \text{ nm}$



rhodamine 6G

$\lambda_{\text{max},A}: 518 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 543 \text{ nm}$



CY3

$\lambda_{\text{max},A}: 552 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max},E}: 565 \text{ nm}$

Tab. III (2. Fortsetzung)

A (nm)	E (nm)	Farbstoffe
349 336	448 490	AMCA ADANS
495 505 494 496	503 513 515 516	BODIPY 493/503 BODIPY LF 6-FAM, Fluorescein 6-OREGON Green 488
521 518 531 528 527	536 543 545 547 548	TET Rhodamin 6G (6-R6G) BODIPY FL Br2 BODIPY R6G 6-JOE
535 535	552 555	BODIPY 530/550 HEX
552 559	565 569	Cy3 BODIPY 558/568
542 546 560	574 579 580	BODIPY TMR 542/574 5-TAMRA NED
575 583 588	602 603 616	6-ROX TEXAS Red BODIPY TR 589/617
630 625 646 651	640 640 660 674	Light Cycler RED 640 BODIPY 630/650 BODIPY 650/665 Cy5
700 678 685 685 743 787	710 703 705 705 767 807	Light Cycler Red Cy 5.5 IRD 700 La Jolla Blue Cy 7 IRD 41

A = Absorption

E = Emission

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetection von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man
 - b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
 - c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

t_p der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$ der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Errei-

chen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

2. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) im Transkript kodiert, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

t_p der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$ der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Errei-

chen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

3. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv A enthält, amplifiziert wird, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sonde-molekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $C_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

t_p der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$ der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

- 40 -

4. Verfahren zur Amplifikation und zum quantitativen Nachweis einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv B enthält, amplifiziert wird, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

t_p der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$ der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA®, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.
12. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

13. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.
15. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.
16. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
17. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.
18. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er
 - a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' im Transkript kodiert,
 - b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
 - c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation,#

- d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

19. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' im Transkript kodiert,
- b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
- c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation,
- d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

20. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) zwei Amplifikationsprimer,
- b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
- c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls

d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

21. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) zwei Amplifikationsprimer,
- b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
- c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

22. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.

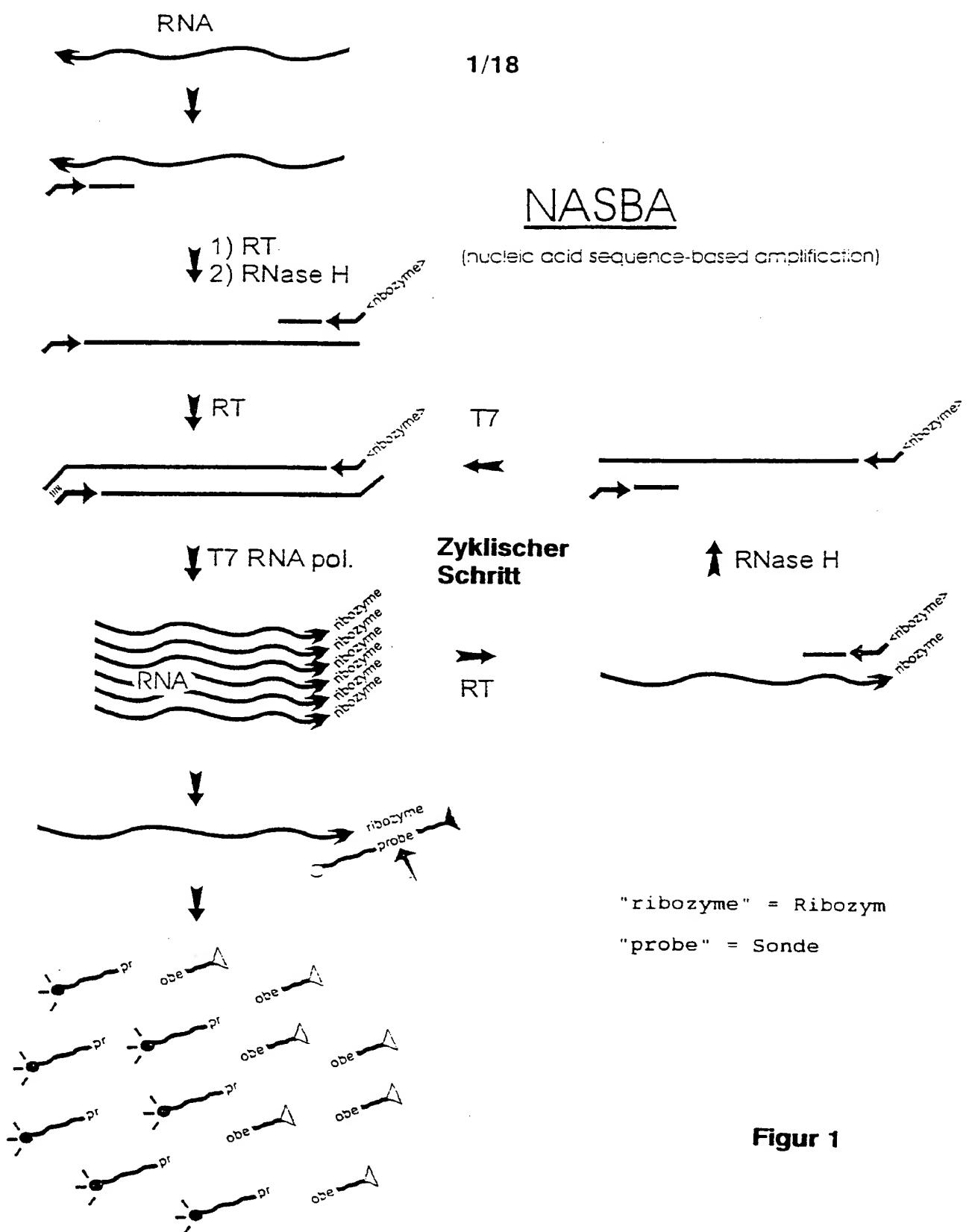
23. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.

24. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.

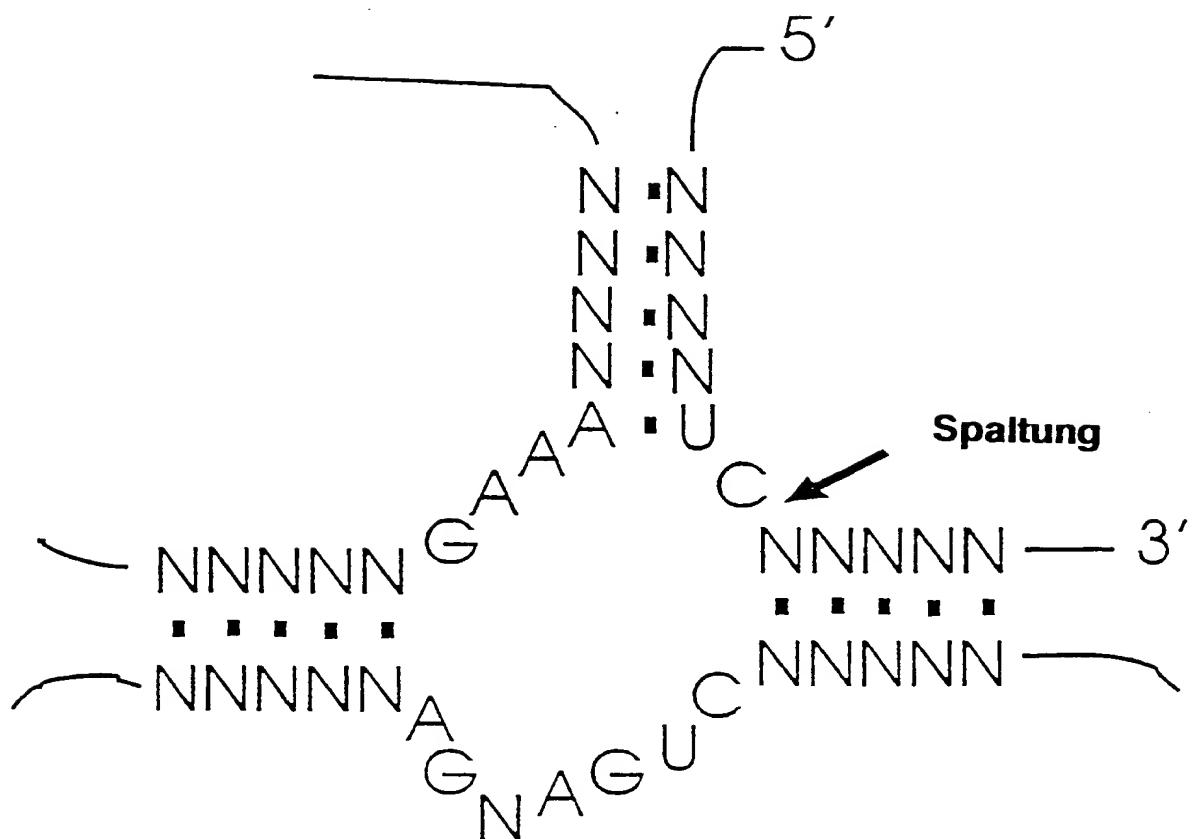
25. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.

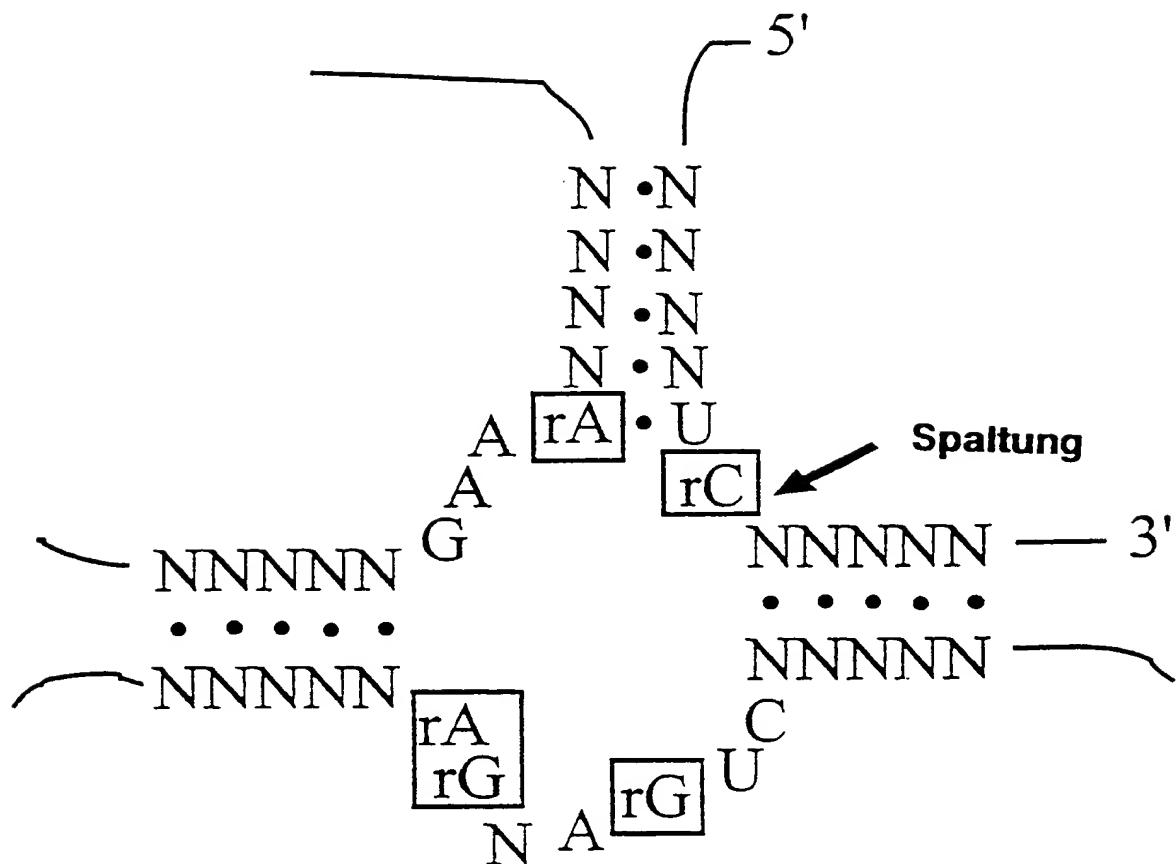
- 45 -

26. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA®, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
28. Kit nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zur Durchführung einer NASBA® ist, wobei die Enzyme die Aktivität von Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H aufweisen.
29. Kit nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme zur Durchführung der NASBA® Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H sind.
30. Kit zur Durchführung des Verfahren nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Sonde mit einer zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls weitere zur Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.
31. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 30, dadurch gekennzeichnet, der Reporter ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und der Quencher ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR ist.



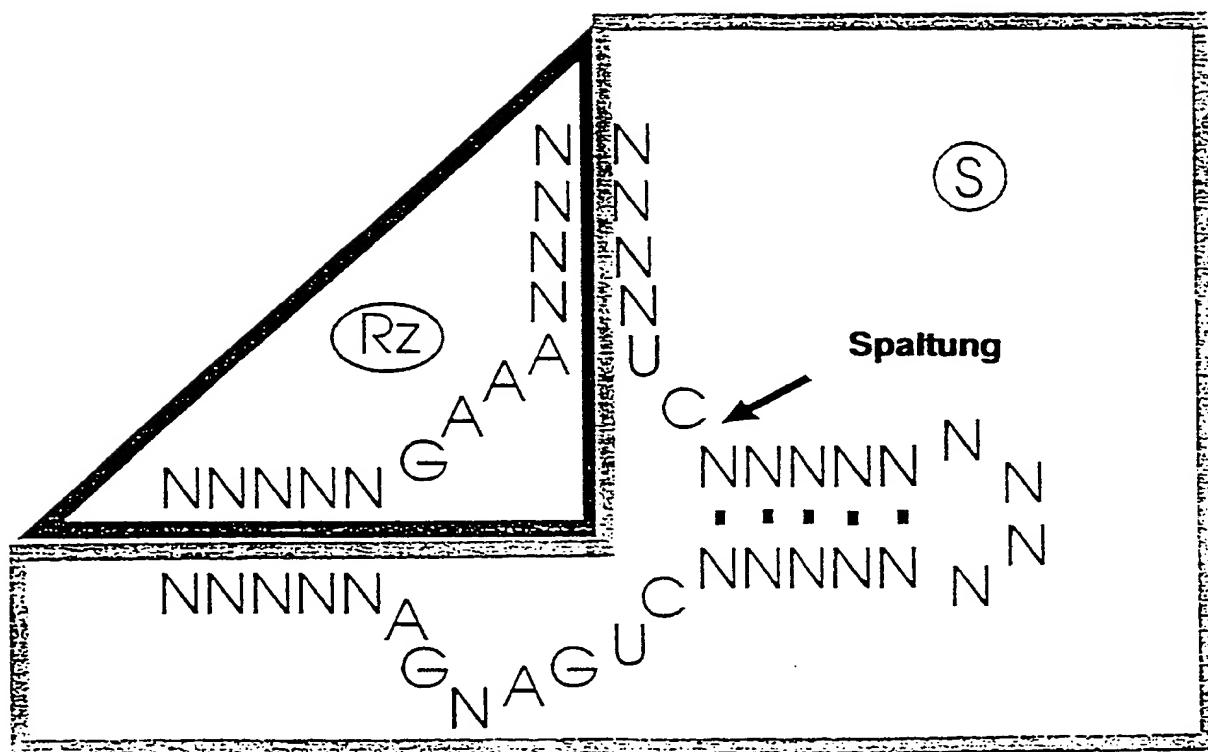
2/18

Figur 2A

Figur 2B

Figur 3

4/18

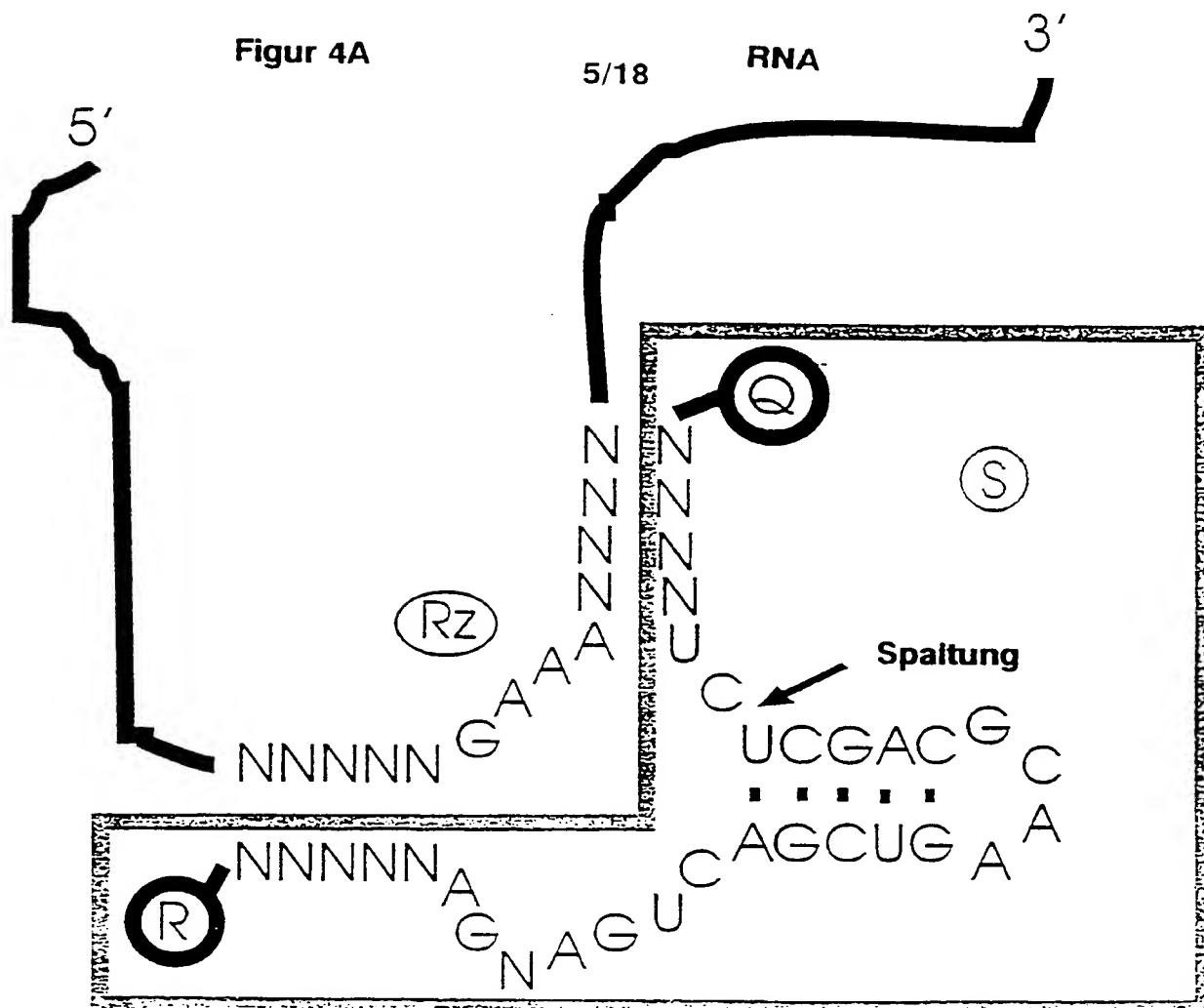


Figur 4A

5/18

RNA

3'

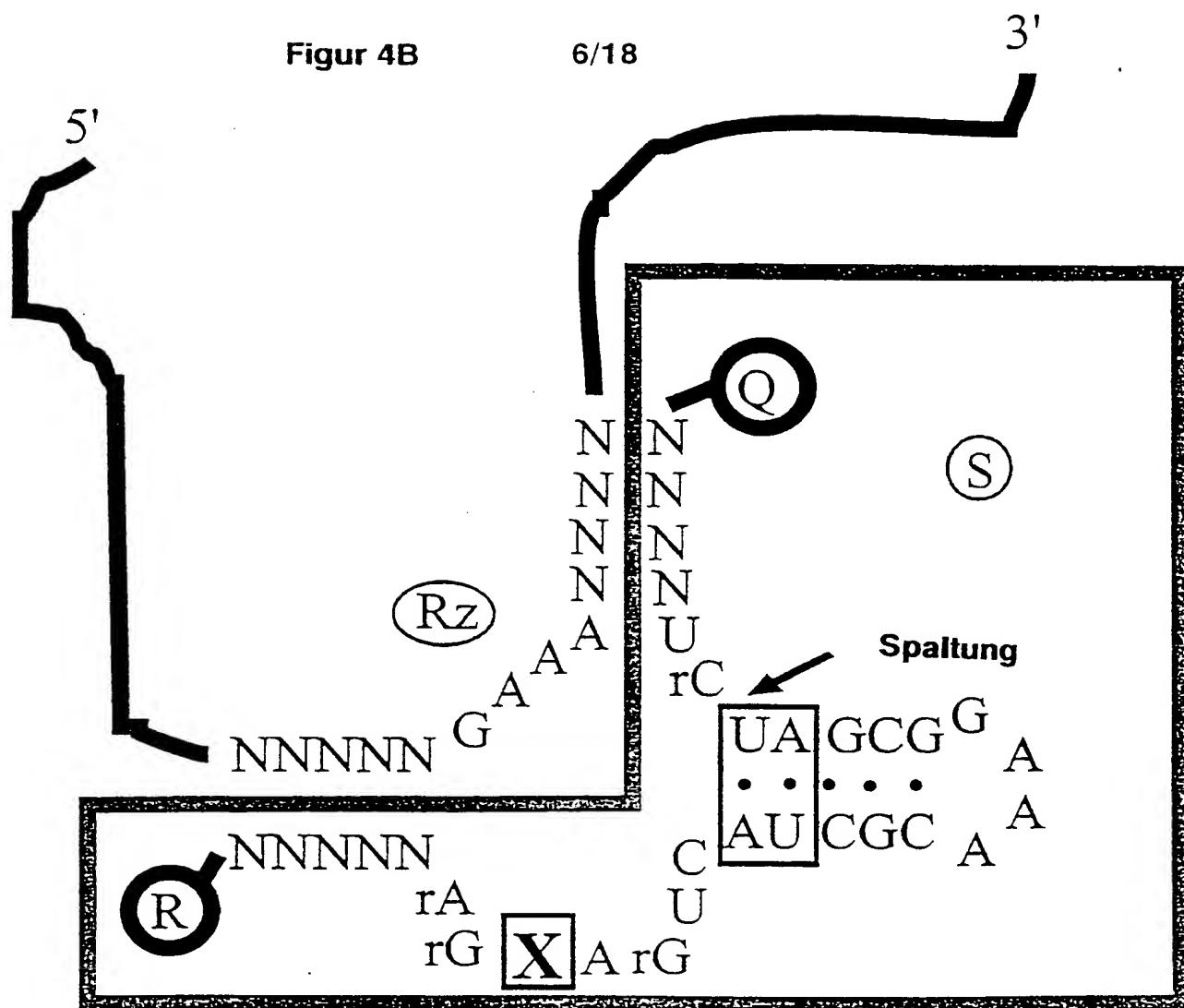


R = FAM
HEX
TET
ALEXA

Q = TAMRA
CY-5
DABCYL
LCR
etc.

Figur 4B

6/18



R = FAM
HEX
TET
ALEXA

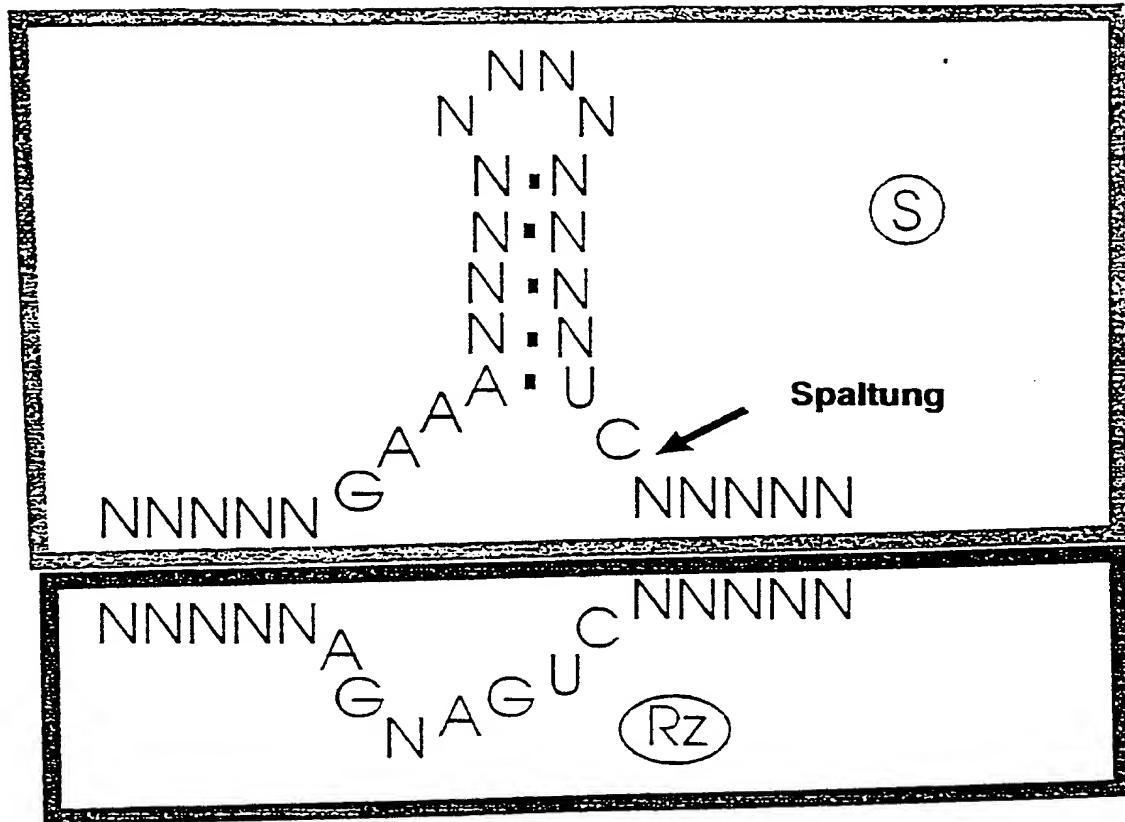
Q = TAMRA
CY-5
DABCYL
LCR

X = Pyridin-4-on

r = essentielle Ribonukleotide

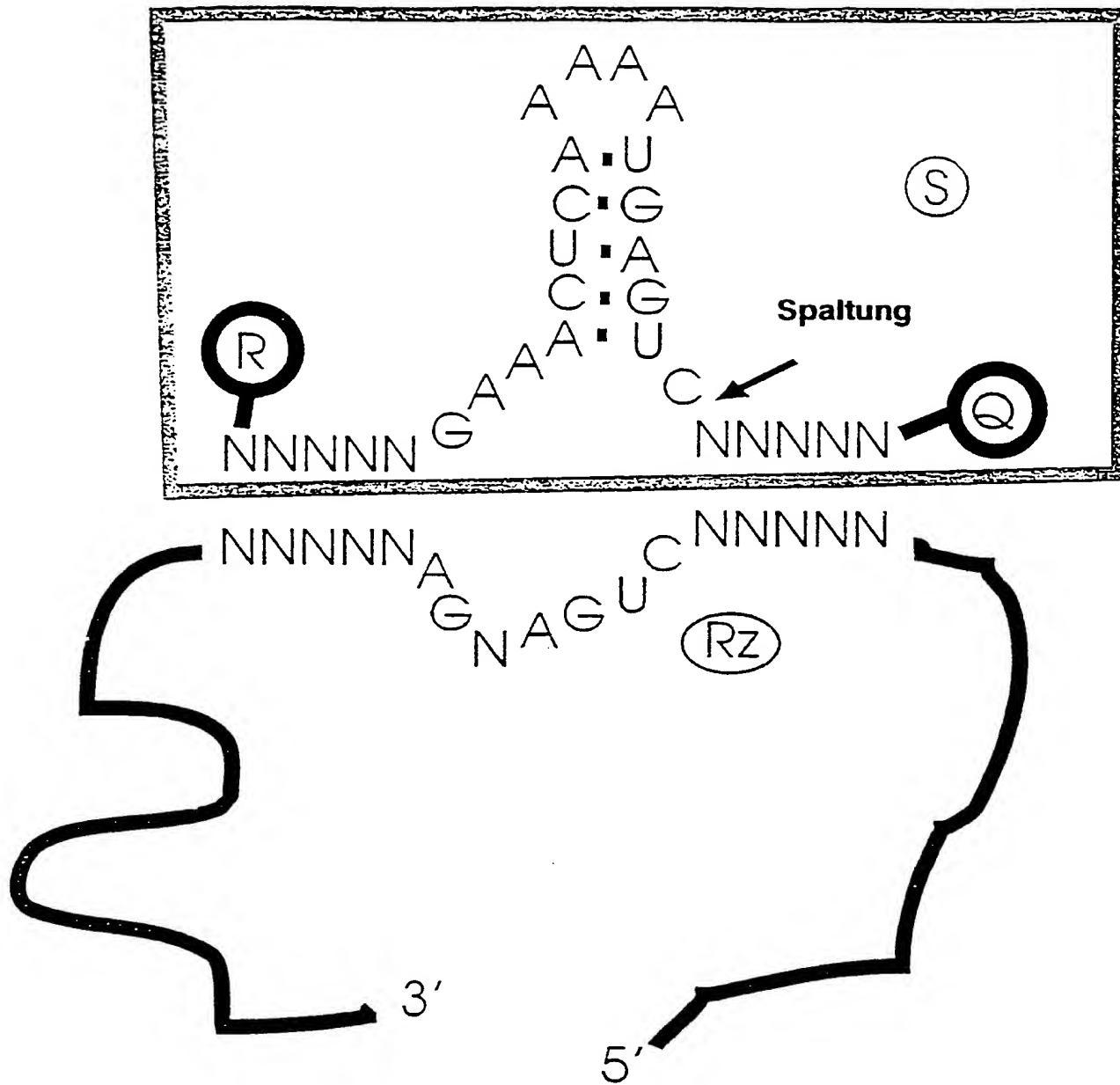
wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop

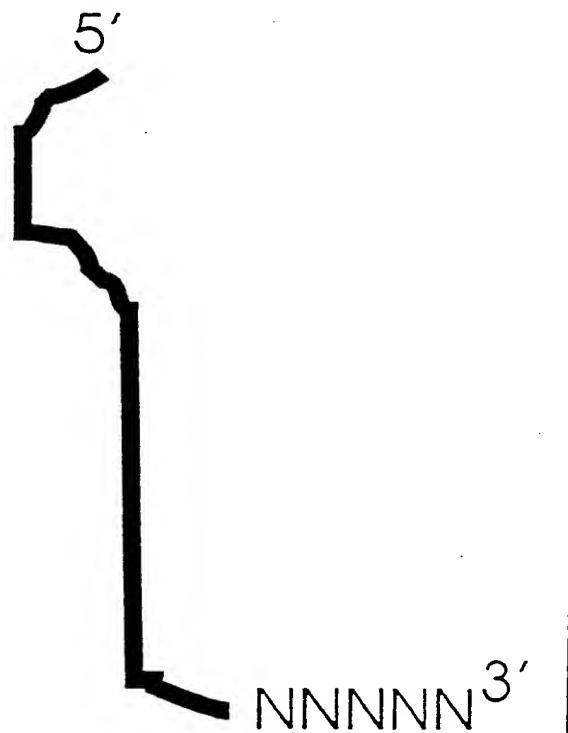
7/18

Figur 5

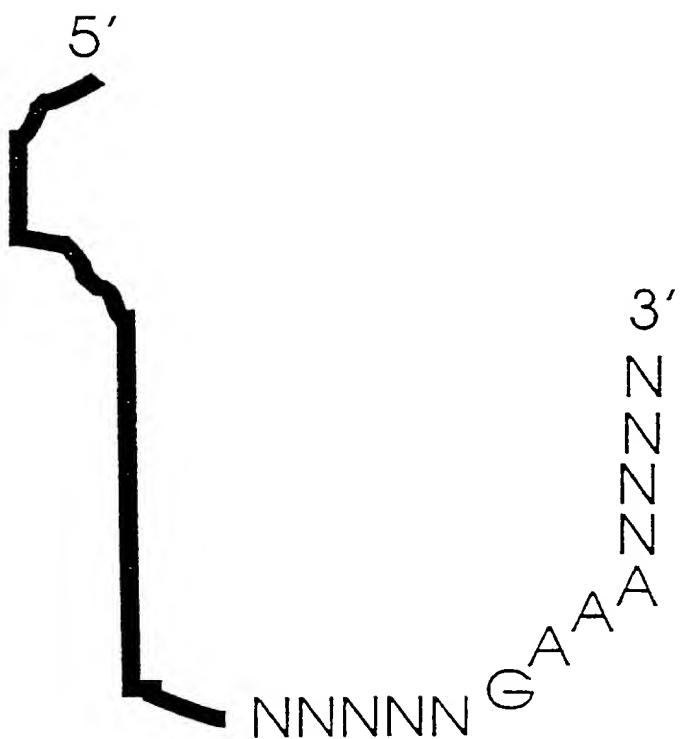
Figur 6

8/18



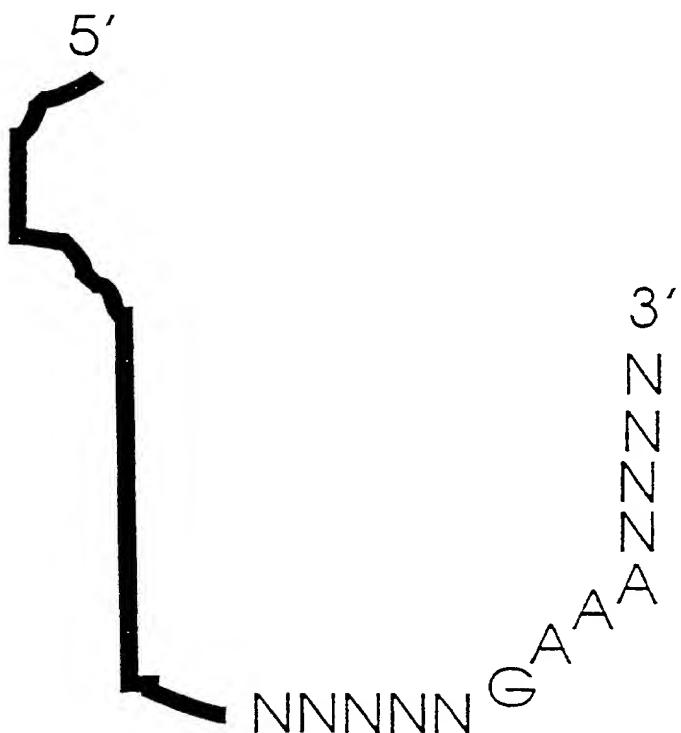
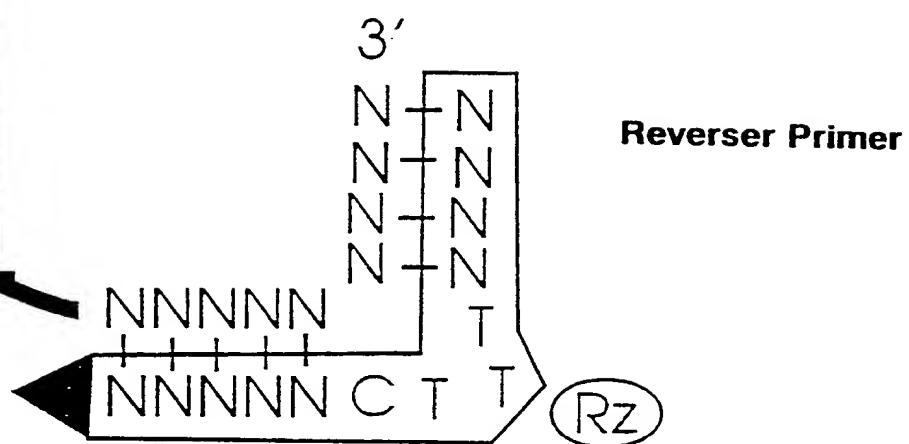


Figur 7

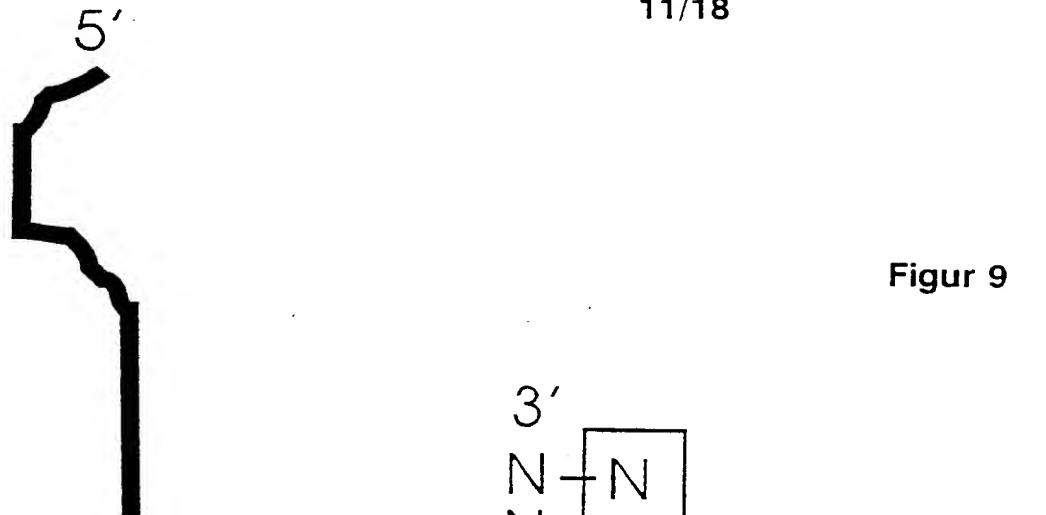


5'
10/18

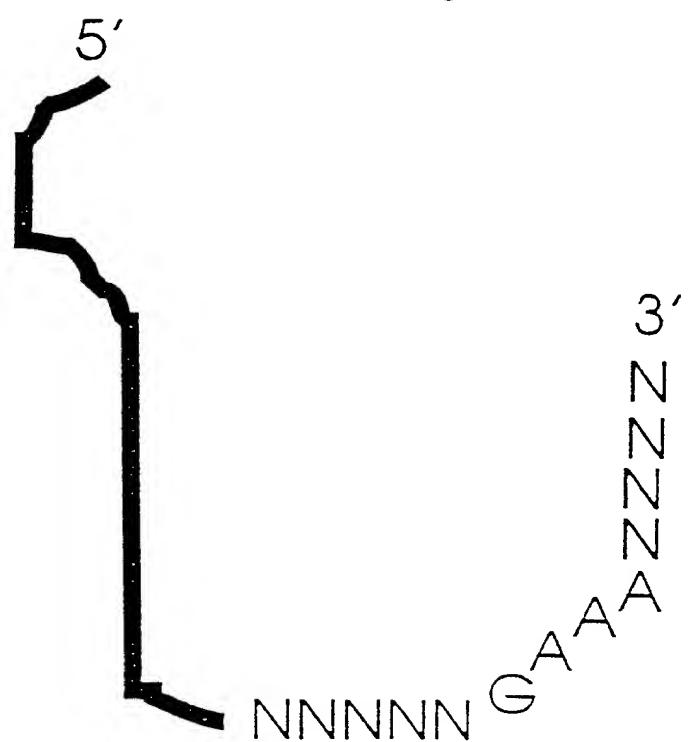
Figur 8

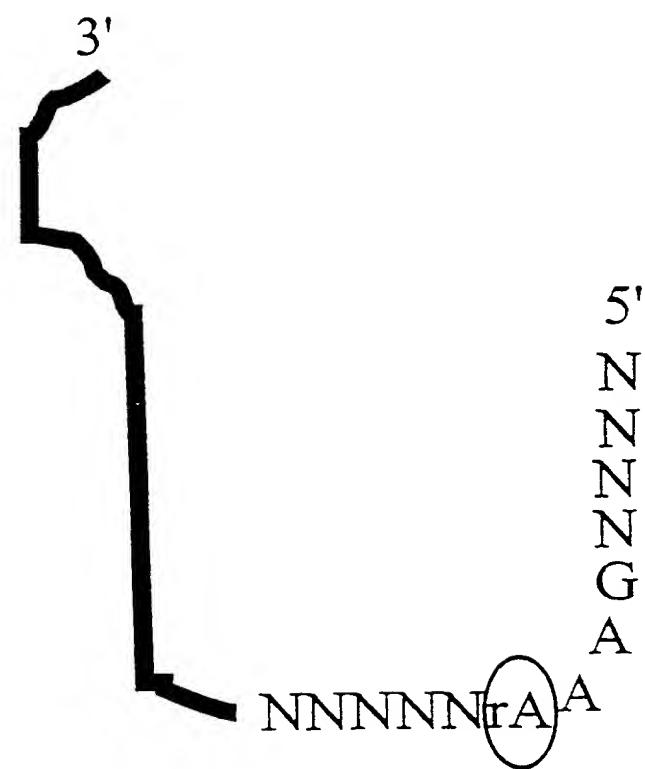
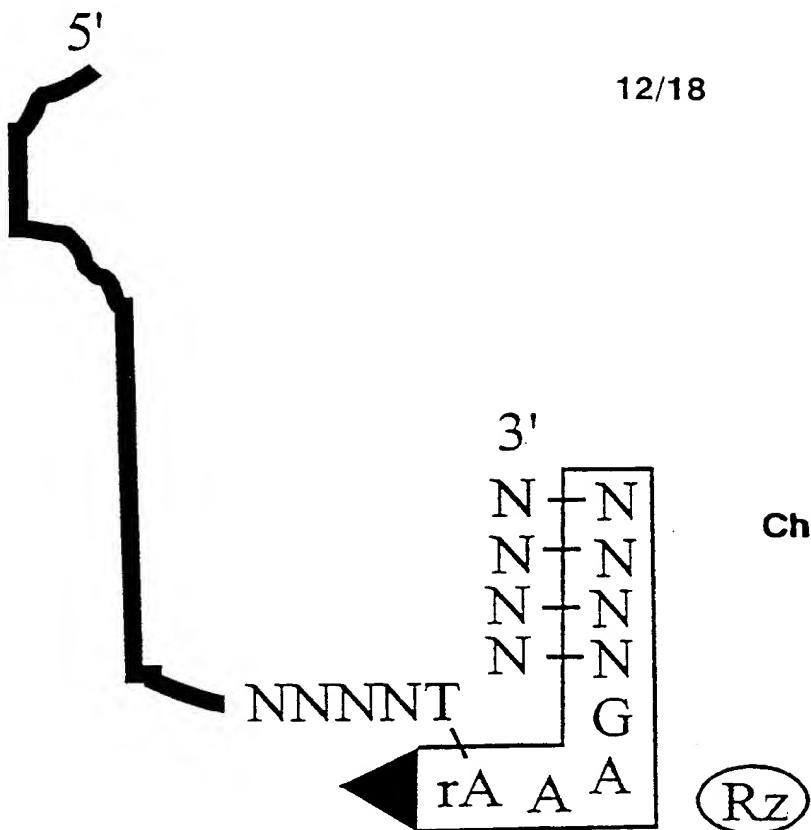


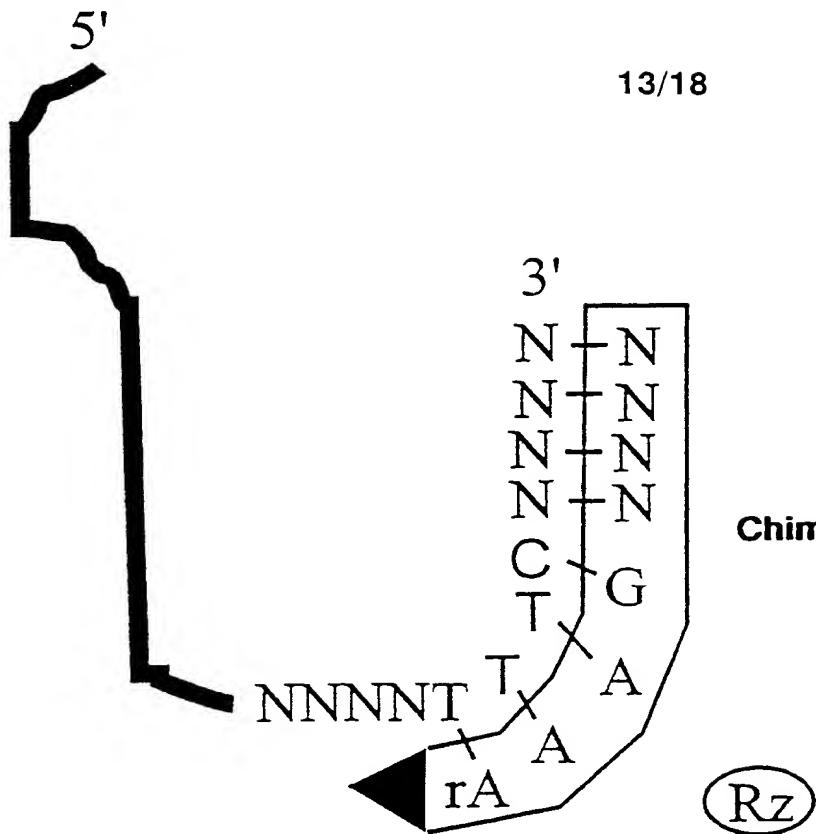
11/18



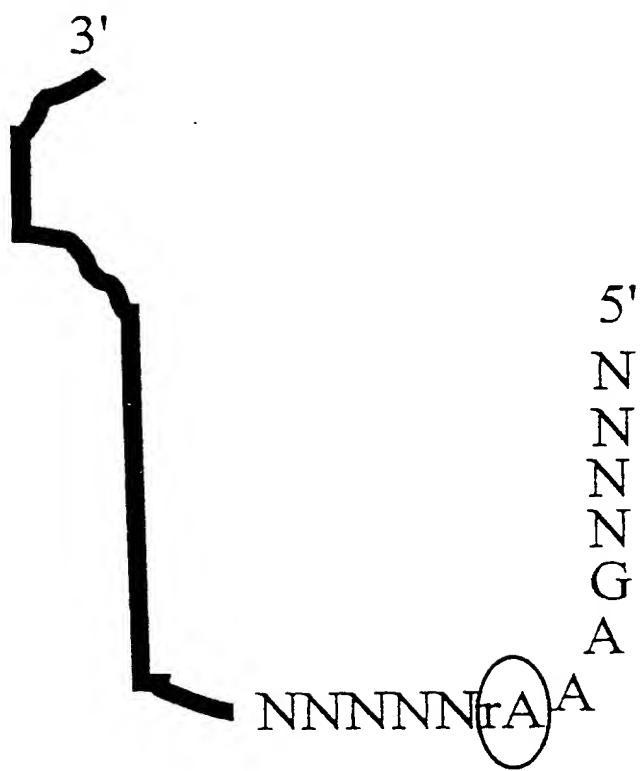
Figur 9

Reverser Primer

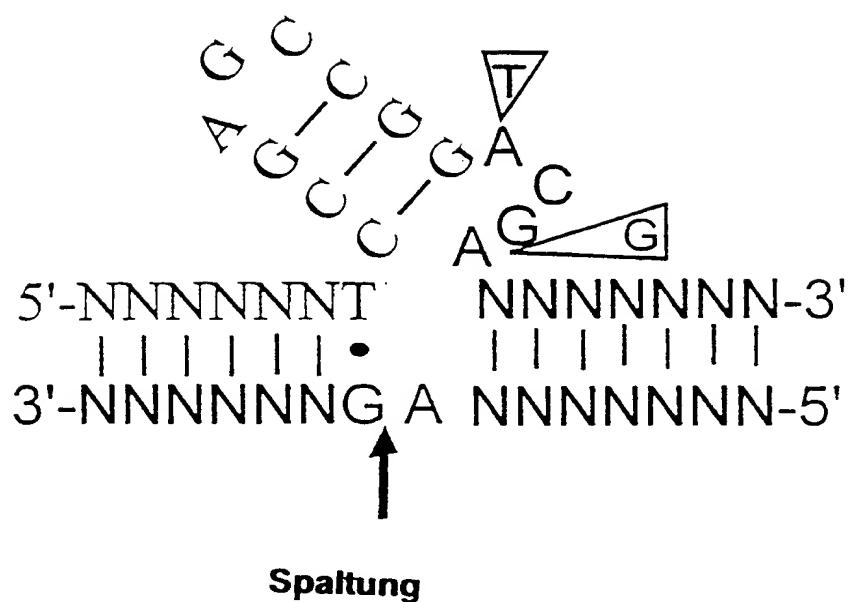




Figur 11



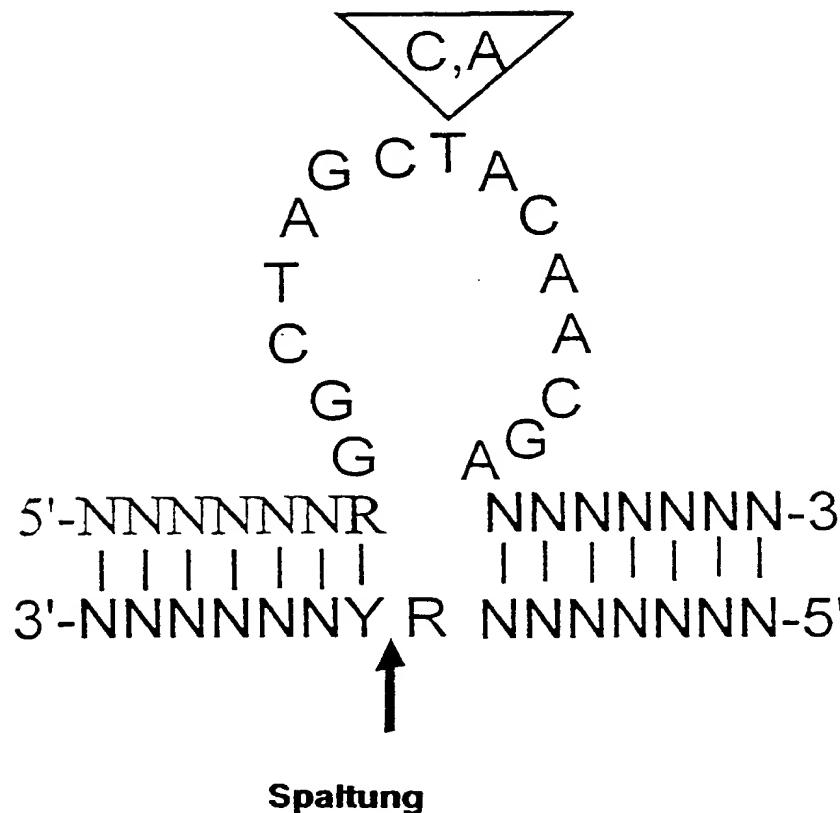
14/18



Figur 12

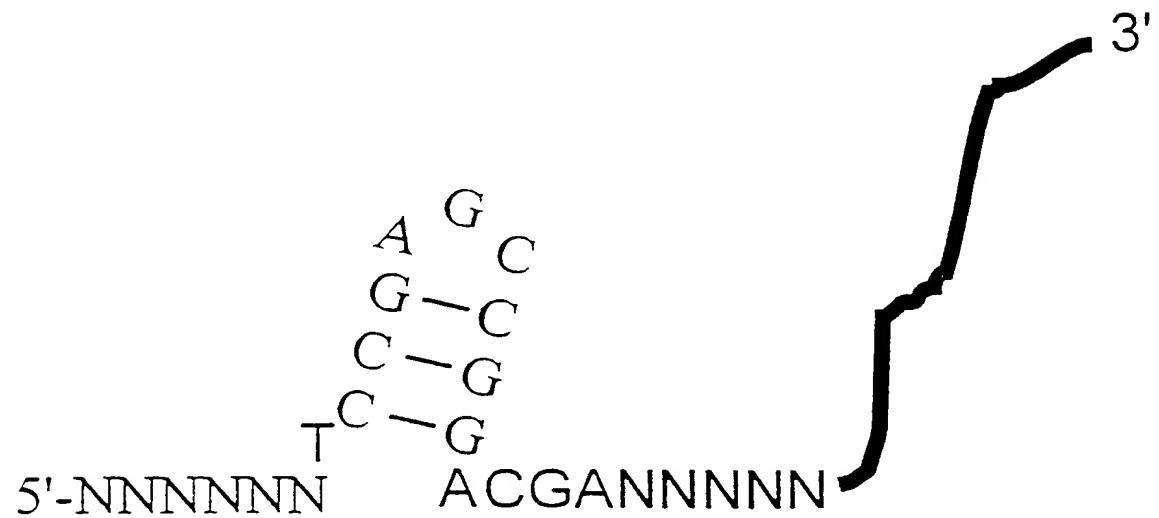
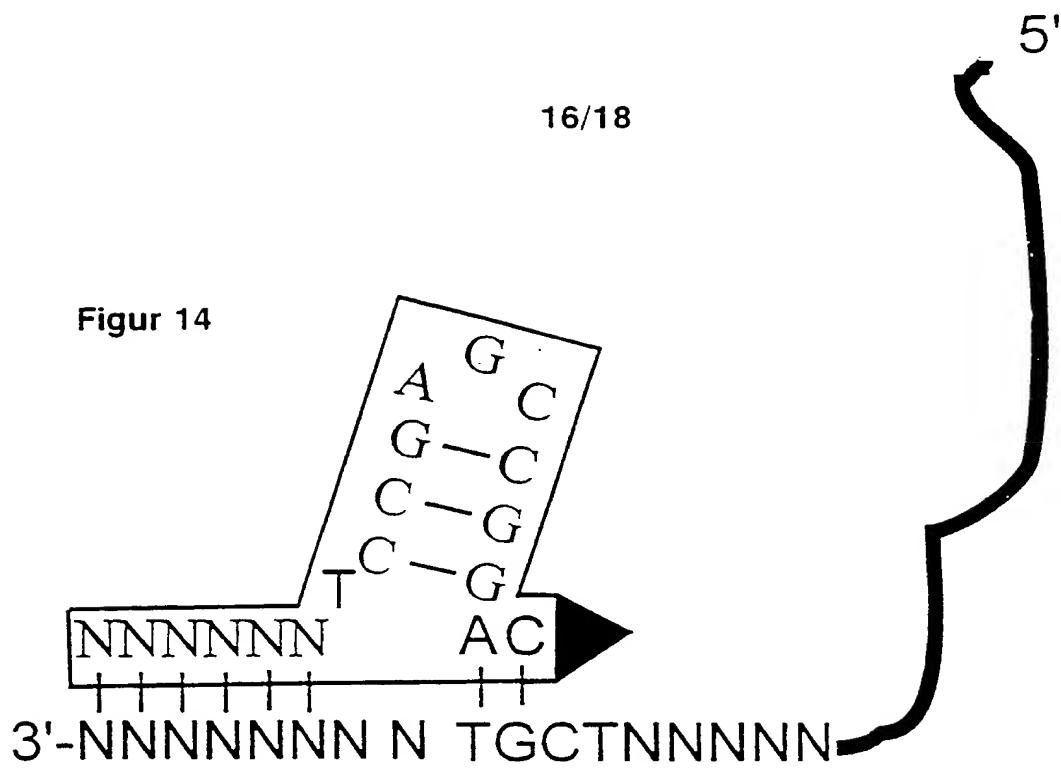
DNA-zyme: Prototype A

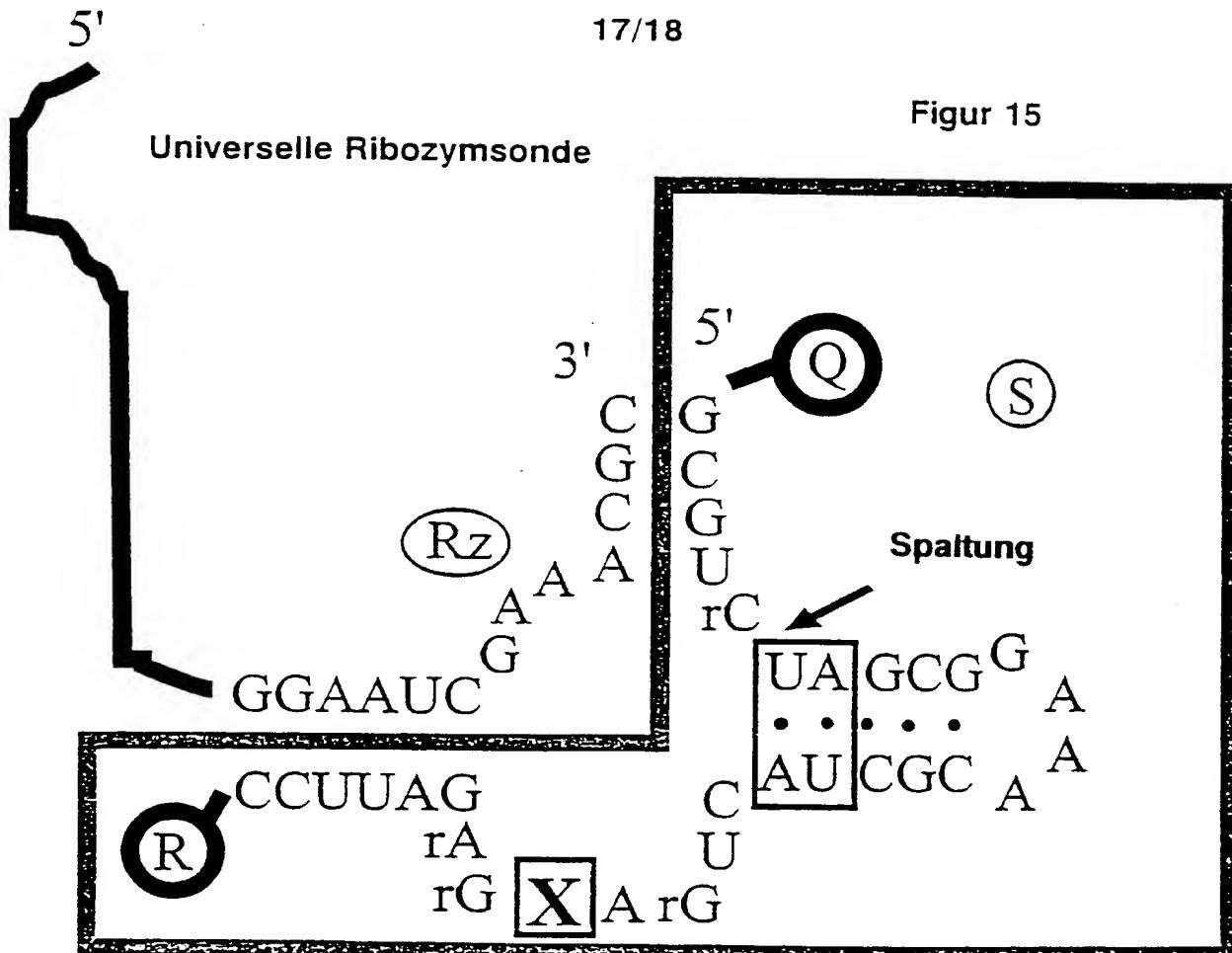
15/18



Figur 13

DNA-zyme: Prototype B





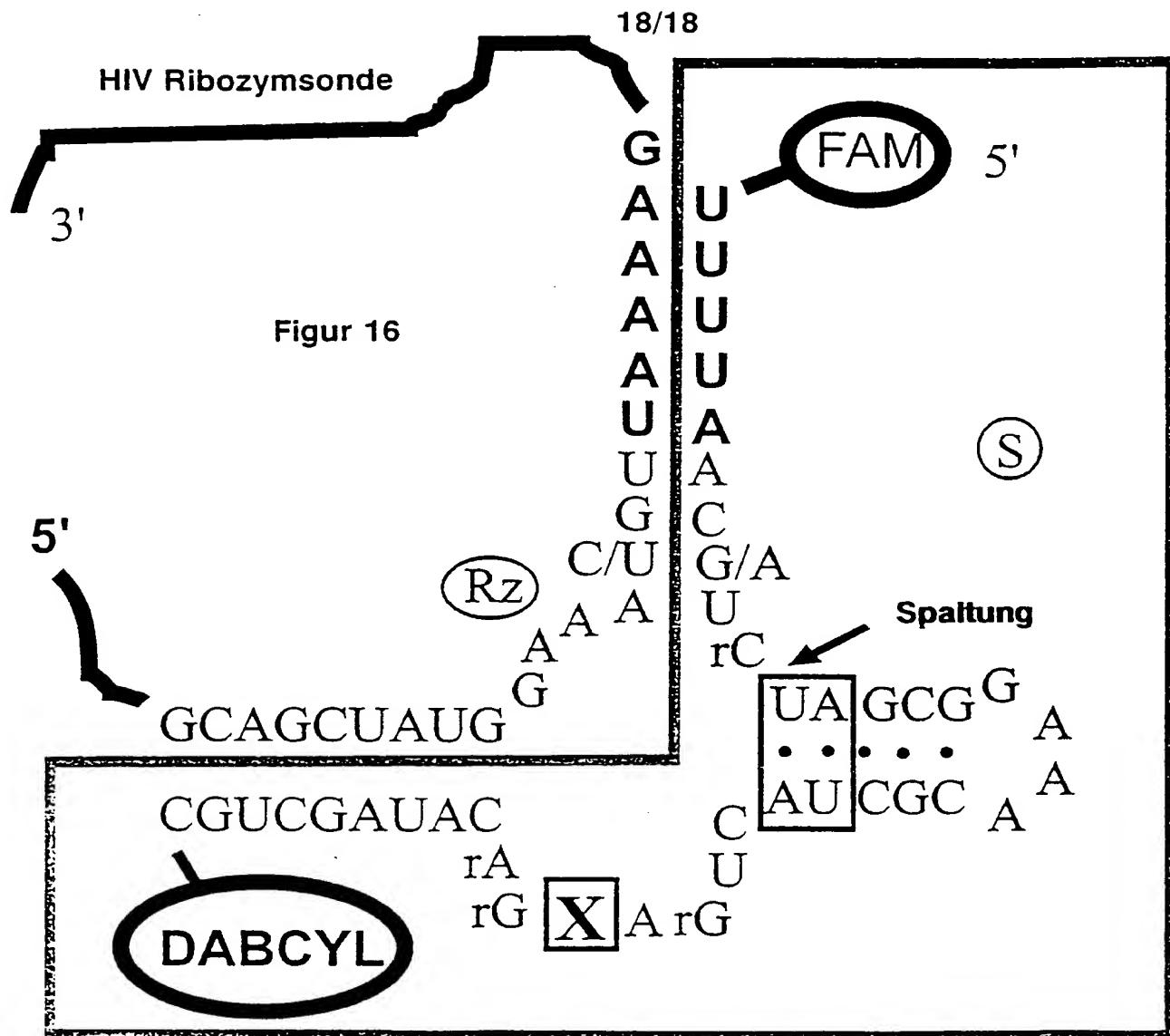
R = FAM
HEX
TET
ALEXA

Q = TAMRA
CY-5
DABCYL
LCR
etc.

X = Pyridin-4-on

r = essentielle Ribonukleotide

wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. No. Application No
PCT/EP 99/07127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C1201/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C120

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 27026 A (KRUPP GUIDO ;TIKOCINSKI YARON (IL); ASHER NATHAN (IL); FRIEDMANN) 6 September 1996 (1996-09-06) the whole document ---	1-31
Y	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 96-419828 XP002111692 & JP 08 205897 A (NIKKON CORP), 13 August 1996 (1996-08-13) abstract ---	1-31
Y	WO 90 14439 A (GENE TRAK SYSTEMS) 29 November 1990 (1990-11-29) the whole document ---	1-31 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 March 2000

Date of mailing of the international search report

07/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HANNE A ET AL: "Fluorescence energy transfer (FRET) to follow ribozyme reactions in real time" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, US, MARCEL DEKKER, INC, vol. 17, no. 9/11, 1998, pages 1835-1850-1850, XP002111690 ISSN: 0732-8311 the whole document ---	1-31
A	WO 94 13833 A (INNOVIR LAB INC) 23 June 1994 (1994-06-23) the whole document ---	
A	EP 0 525 882 A (AKZO NV) 3 February 1993 (1993-02-03) See claim 6 the whole document ---	
A	LEONE ET AL.: "MOLECULAR BEACON PROBES COMBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ENABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF RNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 9, 1998, pages 2150-2155, XP002134179 the whole document ---	
A	EP 0 707 076 A (AMOCO CORP) 17 April 1996 (1996-04-17) the whole document ---	
A	WO 96 17086 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; JOYCE GERALD F (US); BREAKER RONALD R (US)) 6 June 1996 (1996-06-06) the whole document ---	
P,X	WO 99 47704 A (JENNE ANDREAS ; FAMULOK MICHAEL (DE)) 23 September 1999 (1999-09-23) the whole document ---	1-31
P,X	JENNE A: "REAL-TIME CHARACTERIZATION OF RIBOZYMES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, DE, VERLAG CHEMIE, WEINHEIM, vol. 38, no. 9, 3 May 1999 (1999-05-03), pages 1300-1303-1303, XP002111691 ISSN: 0570-0833 the whole document -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l filing date Application No

PCT/EP 99/07127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9627026	A 06-09-1996	IL 112799 A		12-03-1999
		AU 697317 B		01-10-1998
		AU 5416596 A		18-09-1996
		BR 9607267 A		15-12-1998
		CA 2213622 A		06-09-1996
		CN 1183812 A		03-06-1998
		EP 0822992 A		11-02-1998
		JP 11500917 T		26-01-1999
		NO 973926 A		08-10-1997
JP 8205897	A 13-08-1996	NONE		
WO 9014439	A 29-11-1990	US 5112734 A		12-05-1992
		AU 5674590 A		18-12-1990
		DE 69018631 D		18-05-1995
		DE 69018631 T		10-08-1995
		EP 0473693 A		11-03-1992
		JP 4506748 T		26-11-1992
WO 9413833	A 23-06-1994	AU 675482 B		06-02-1997
		AU 5739694 A		04-07-1994
		EP 0681613 A		15-11-1995
		JP 8507202 T		06-08-1996
		US 5589332 A		31-12-1996
EP 0525882	A 03-02-1993	AU 670535 B		25-07-1996
		AU 2071892 A		11-03-1993
		CA 2075147 A		03-02-1993
		FI 923447 A		03-02-1993
		JP 5219999 A		31-08-1993
		US 5834255 A		10-11-1998
		ZA 9205631 A		28-04-1993
EP 0707076	A 17-04-1996	DE 68926484 D		20-06-1996
		DE 68926484 T		05-12-1996
		EP 0361983 A		04-04-1990
		JP 2257898 A		18-10-1990
		US 5763171 A		09-06-1998
		US 5472840 A		05-12-1995
WO 9617086	A 06-06-1996	US 5807718 A		15-09-1998
		AU 710747 B		30-09-1999
		AU 4595096 A		19-06-1996
		BR 9510003 A		21-10-1997
		CA 2205382 A		06-06-1996
		CN 1173207 A		11-02-1998
		EP 0792375 A		03-09-1997
		FI 972333 A		31-07-1997
		HU 77576 A		29-06-1998
		JP 10510165 T		06-10-1998
		NO 972483 A		04-08-1998
WO 9947704	A 23-09-1999	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte Aktenzeichen
PCT/Erl 99/07127

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C1201/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C120

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 27026 A (KRUPP GUIDO ;TIKOCHINSKI YARON (IL); ASHER NATHAN (IL); FRIEDMANN) 6. September 1996 (1996-09-06) das ganze Dokument	1-31
Y	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 96-419828 XP002111692 & JP 08 205897 A (NIKKON CORP), 13. August 1996 (1996-08-13) Zusammenfassung	1-31
Y	WO 90 14439 A (GENE TRAK SYSTEMS) 29. November 1990 (1990-11-29) das ganze Dokument	1-31

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

² Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine händliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

29. März 2000

07/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07127

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HANNE A ET AL: "Fluorescence energy transfer (FRET) to follow ribozyme reactions in real time" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, US, MARCEL DEKKER, INC, Bd. 17, Nr. 9/11, 1998, Seiten 1835-1850-1850, XP002111690 ISSN: 0732-8311 das ganze Dokument ---	1-31
A	WO 94 13833 A (INNOVIR LAB INC) 23. Juni 1994 (1994-06-23) das ganze Dokument ---	
A	EP 0 525 882 A (AKZO NV) 3. Februar 1993 (1993-02-03) See claim 6 das ganze Dokument ---	
A	LEONE ET AL.: "MOLECULAR BEACON PROBES COMBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ENABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF RNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 9, 1998, Seiten 2150-2155, XP002134179 das ganze Dokument ---	
A	EP 0 707 076 A (AMOCO CORP) 17. April 1996 (1996-04-17) das ganze Dokument ---	
A	WO 96 17086 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; JOYCE GERALD F (US); BREAKER RONALD R (US)) 6. Juni 1996 (1996-06-06) das ganze Dokument ---	
P,X	WO 99 47704 A (JENNE ANDREAS ; FAMULOK MICHAEL (DE)) 23. September 1999 (1999-09-23) das ganze Dokument ---	1-31
P,X	JENNE A: "REAL-TIME CHARACTERIZATION OF RIBOZYMES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, DE, VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, Bd. 38, Nr. 9, 3. Mai 1999 (1999-05-03), Seiten 1300-1303-1303, XP002111691 ISSN: 0570-0833 das ganze Dokument -----	1-31

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur Patentfamilie gehören

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 99/07127

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9627026 A	06-09-1996	IL AU AU BR CA CN EP JP NO	112799 A 697317 B 5416596 A 9607267 A 2213622 A 1183812 A 0822992 A 11500917 T 973926 A	12-03-1999 01-10-1998 18-09-1996 15-12-1998 06-09-1996 03-06-1998 11-02-1998 26-01-1999 08-10-1997
JP 8205897 A	13-08-1996	KEINE		
WO 9014439 A	29-11-1990	US AU DE DE EP JP	5112734 A 5674590 A 69018631 D 69018631 T 0473693 A 4506748 T	12-05-1992 18-12-1990 18-05-1995 10-08-1995 11-03-1992 26-11-1992
WO 9413833 A	23-06-1994	AU AU EP JP US	675482 B 5739694 A 0681613 A 8507202 T 5589332 A	06-02-1997 04-07-1994 15-11-1995 06-08-1996 31-12-1996
EP 0525882 A	03-02-1993	AU AU CA FI JP US ZA	670535 B 2071892 A 2075147 A 923447 A 5219999 A 5834255 A 9205631 A	25-07-1996 11-03-1993 03-02-1993 03-02-1993 31-08-1993 10-11-1998 28-04-1993
EP 0707076 A	17-04-1996	DE DE EP JP US US	68926484 D 68926484 T 0361983 A 2257898 A 5763171 A 5472840 A	20-06-1996 05-12-1996 04-04-1990 18-10-1990 09-06-1998 05-12-1995
WO 9617086 A	06-06-1996	US AU AU BR CA CN EP FI HU JP NO	5807718 A 710747 B 4595096 A 9510003 A 2205382 A 1173207 A 0792375 A 972333 A 77576 A 10510165 T 972483 A	15-09-1998 30-09-1999 19-06-1996 21-10-1997 06-06-1996 11-02-1998 03-09-1997 31-07-1997 29-06-1998 06-10-1998 04-08-1998
WO 9947704 A	23-09-1999	KEINE		

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESEN**

PCT

REC'D 15 MAY 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T16

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 51759	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07127	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/09/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 26/03/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder ARTUS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNO		

<ol style="list-style-type: none"> 1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt. 2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts. <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT). <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 9 Blätter.</p>
<ol style="list-style-type: none"> 3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten: <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 12/10/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 10.05.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Thiele, U Tel. Nr. +49 89 2399 8643



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07127

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-36 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-29 eingegangen am 23/04/2001 mit Schreiben vom 20/04/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/18-18/18 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-36, eingereicht mit Schreiben vom 06.01.00.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
 - in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

INTERNATIONALER VORLAUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07127

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N) Ja: Ansprüche 1-29
Nein: Ansprüche

Erfinderische Tätigkeit (ET) Ja: Ansprüche 1-29
Nein: Ansprüche

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) Ja: Ansprüche 1-29
Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

**INTERNATIONALER VORLAUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07127

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Sektion I

Seiten 1 - 36: Gemäß Regel 13ter.(f) PCT sind nach dem Anmeldetag eingereichte Sequenzprotokolle (hier: mit Schreiben vom 06.01.2000) nicht Bestandteil der Anmeldung und werden diesem schriftlichen Bescheid / internationalen vorläufigen Prüfungsbericht nicht beigegeben.

Die mit Schreiben vom 20.04.01 eingereichten Änderungen stehen im Einklang mit den Erfordernissen des Art. 34(2)(b) PCT.

Sektion V

- 1) Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 96 27026 A

D2: DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 96-419828 XP002111692 & JP 08 205897 A (NIKKON CORP), 13. August 1996 (1996- 08- 13)

D3: WO 90 14439 A (GENE TRAK SYSTEMS) 29. November 1990 (1990-11-29)

D4: NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, US, MARCEL DEKKER, INC, Bd. 17, Nr. 9/11, 1998, Seiten 1835-1850-1850

D5: NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 9, 1998, Seiten 2150-2155, zitiert auf Seite 3 der vorliegenden Anmeldung

- 2) Der Gegenstand der Ansprüche 1 - 4 scheint neu zu sein und auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen (Art. 33(2), (3) PCT).

D1 offenbart lediglich die Verwendung von Ribozymen als Reportermoleküle zur Detektion von Biomolekülen. In einer Ausführungsform, bei der das nachzuweisende Biomolekül eine Nukleinsäure ist, wird vorgeschlagen, das funktionsfähige Ribozym aus zwei Oligonukleotiden, die die nachzuweisende Nukleinsäure erst zusammenbringt, entstehen zu lassen (siehe Seite 25, letzter Absatz ff).

D2 benutzt lediglich Ribozyme als Markierungen in spezifischen Bindungsassays. Eine doppelsträngigen DNA Sequenz bildet das "template" in der Ribozymsynthese.

D3 beschreibt lediglich Verfahren zur Vervielfältigung von RNA. In einer Ausführungsform kann ein Primer eine DNA Sequenz enthalten, die als "template" für ein Ribozym dient (Seite 17, Zeilen 15ff).

D4 beschäftigt sich mit Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer (FRET) zum Verfolgen von Ribozymreaktionen in Echtzeit. Lediglich unter bestimmten speziellen Bedingungen, u.a. in Gegenwart von 10% EtOH, konnte eine Hammerkopf-RNA Spaltungsreaktion beobachtet werden (siehe Seite 1842).

D5 schließlich schlägt bereits einen Ansatz zur Echtzeitdetektion von NASBA-amplifizierter DNA vor, bei dem eine zweifach fluoreszenzmarkierte Sonde verwendet wird.

Der gegenwärtige Anmelder scheint der erste gewesen zu sein, der erkannte, daß bei dem Verfahren nach D5 eine Reihe von Problemen auftreten können (siehe Seite 3, Zeile 14ff), die zu falsch positiven Resultaten führen und nur eine sehr schlechte Quantifizierung erlauben. Somit hätte der Fachmann, ausgestattet mit dem Wissen aus D1 - D5, keine erkennbare Motivation gehabt, das Verfahren aus D4 abzuändern, und zudem schon gar nicht unter Anwendung der mit Unsicherheiten und Beschränkungen behafteten Technik aus D4. D1 - D3 bieten ebenfalls keinen Ansatzpunkt für das in Erwägung-Ziehen von Amplifikations-Detektionsreaktionen, bei denen zwei auf verschiedenen Nukleinsäuren befindliche Motive zur Ausbildung des Ribozyms erforderlich sind (siehe auch vorliegende Beschreibung, Seiten 8 und 9 überbrückender Absatz).

Die neuen Amplifikationsverfahren gemäß Ansprüchen 1 - 4, die sämtlich auf dem gleichen Prinzip beruhen, können somit als erfinderisch angesehen werden.

- 3) Die Kits aus Ansprüchen 16 - 19 scheinen im Hinblick auf den bekannten Stand der Technik neu zu sein (Art. 33(2) PCT) und sind darüberhinaus speziell an die Verfahren aus Ansprüchen 1 - 4 angepasst. Folglich kann das Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit anerkannt werden (Art. 33(3) PCT).

- 4) Die Ansprüche 5 - 11 und 20 - 29 erfüllen die Erfordernisse der Neuheit und erfinderischen Tätigkeit kraft ihres Abhängigkeitsverhältnisses (Art. 33(2), (3) PCT).
- 5) Das Verfahren gemäß Anspruch 12 sowie gemäß abhängiger Ansprüche 13 - 15 erfüllt ebenfalls die Erfordernisse der Artikel 33(2) und (3) PCT nach Neuheit und Vorliegen erfinderischer Tätigkeit.

Der Fachmann ausgestattet mit dem Wissen des Stands der Technik (siehe Punkt 2 oben), insbesondere D4, hätte weder Anleitung gehabt Erreger über ein 5'-GAAA-3' Ribozym-Motiv in der 16s RNA nachzuweisen, noch hätte er eine große Aussicht auf Erfolg in der Übertragung der auf spezielle Bedingungen angewiesenen Technik aus D4 auf komplexe biologische Systeme gesehen.

Zur Erinnerung, D4 (Seite 1842; Figuren) offenbart eine Nukleinsäure, die das Sequenzmotiv A trägt, sowie eine Sonde mit Sequenzmotiv B, Reporter- und Quenchermolekül. Da ein funktionstüchtiges Hammerkopfribozym erst durch Zusammenwirken der beiden Nukleinsäuren über Hybridisierung (siehe Fig. 6) entsteht, wird in der Fluoreszenzreaktion das Vorliegen der ersten Nukleinsäure nachgewiesen.

- 6) Diesem Bescheid liegt die Annahme zugrunde, daß alle Ansprüche die Priorität des Anmeldetags des Prioritätsdokuments (26.03.1999) genießen. Sollte sich später herausstellen, daß dies nicht zutrifft, so könnte das im internationalen Recherchenbericht angegebene Dokument "ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, DE, VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, Bd. 38, Nr. 9, 3. Mai 1999 (1999-05-03), Seiten 1300-1303" relevant werden.

Sektion VI

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)

WO-A-9947704

23.09.1999

17.03.1999

17.03.1998

Sektion VII

- 1) Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D3 und D4 offenbare einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

Sektion VIII

- 1) Die Trivialbezeichnungen der Farbstoffe in Ansprüchen 11, 15 und 29 erlauben nicht eine eindeutige Definition der zugrundeliegenden chemischen Substanzen (Art. 6 PCT).
- 2) Die Verwendung von Markennamen in Ansprüche 10, 25 - 27 (hier:NASBA®) führt zu Unklarheiten hinsichtlich des Schutzbereichs der betroffenen Ansprüche, da erstere sich auf verschiedene Verfahrensvarianten beziehen können (Richtlinien C-II, 4.16; Art. 6 PCT).

PCT/EP99/07127

(P 51759 - 19.04.2001)

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetection von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man
 - b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
 - c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »c_{rel.}« nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{\text{rel.}} = t_p / t_{\text{Ref.}},$$

wobei

t_p der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{\text{Ref.}}$ der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

- 2 -

2. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetection von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) im Transkript kodiert, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

t_p der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$ der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

- 3 -

3. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv A enthält, amplifiziert wird, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{rel.}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

t_p der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$ der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

4. Verfahren zur Amplifikation und zum quantitativen Nachweis einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der

- 4 -

Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv B enthält, amplifiziert wird, wobei man

- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration » $c_{\text{rel.}}$ « nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{\text{rel.}} = t_p / t_{\text{Ref.}},$$

wobei

t_p der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{\text{Ref.}}$ der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

- 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.
- 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.

- 5 -

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA®, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.
12. Verfahren zum Nachweis von bakteriellen Erregern in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit einem das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthaltenden Abschnitt der 16S rRNA der Erreger geeignete Sequenz aufweist und man die Erreger durch Messung des auftretenden Fluoreszenzsignals nachweist.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Erreger aus der Gruppe bestehend aus E. coli, Salmonella, Staphylococcus, C. perfringens, Vibrio, B. cereus, C. botulinum, Campylobacter, Yersinia und Listeria ausgewählt

- 6 -

sind.

14. Verfahren nach den Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.

15. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.

16. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' im Transkript kodiert,
- b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
- c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation,
- d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

17. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' im Transkript kodiert,

- 7 -

- b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
- c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation,
- d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

18. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) zwei Amplifikationsprimer,
- b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
- c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

19. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) zwei Amplifikationsprimer,
- b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
- c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

- 8 -

umfaßt.

20. Kit nach den Ansprüchen 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.
21. Kit nach den Ansprüchen 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.
22. Kit nach den Ansprüchen 16 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.
23. Kit nach den Ansprüchen 16 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
24. Kit nach den Ansprüchen 16 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
25. Kit nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA®, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
26. Kit nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zur Durchführung einer NASBA® ist, wobei die Enzyme die Aktivität von Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H aufweisen.
27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme zur Durchführung der NASBA® Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H sind.
28. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Sonde mit einer zur Hybridisierung mit einem das Sequenzmotiv 5'-GAAA-

- 9 -

3' (Motiv A) enthaltenden Abschnitt der 16S rRNA der Erreger geeigneten Sequenz, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls weitere zur Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.

29. Kit nach den Ansprüchen 16 bis 28, dadurch gekennzeichnet, der Reporter ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und der Quencher ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR ist.

Translation
09/957519

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P 51759	FOR FURTHER ACTION	SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP99/07127	International filing date (<i>day/month/year</i>) 27 September 1999 (27.09.99)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 26 March 1999 (26.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant ARTUS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK UND ENTWICKLUNG MBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 9 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 October 2000 (12.10.00)	Date of completion of this report 10 May 2001 (10.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07127

I. Basis of the report1. With regard to the **elements** of the international application:^{*} the international application as originally filed the description:

pages _____ 1-36 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages 1-29 _____, filed with the letter of 20 April 2001 (20.04.2001)

 the drawings:

pages 1/18-18/18 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is: the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing: contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).^{**}

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 99/07127**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

Pages 1 - 36: Under PCT Rule 13ter (f), sequence listings submitted after the filing date (here: with the letter of 06 January 2000) are not part of the application and are not included in this written report/ international preliminary examination report.

The amendments submitted with the letter of 20 April 2000 meet the requirements of PCT Article 34(2) (b).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/07127

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-29	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-29	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-29	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1) Reference is made to the following documents:

D1: WO 96 27026 A

D2: DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London,
GB; AN 96-419828 XP002111692 & JP 08205897 A (NIKKON
CORP), 13 August 1996 (1996-08-13)

D3: WO 90 14439 A (GENE TRAK SYSTEMS) 29 November
1990 (1990-11-29)

D4: NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, US, MARCEL DEKKER,
INC, Vol. 17, No. 9/11, 1998, pages 1835-1850

D5: NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Vol. 26, No. 9, 1998,
pages 2150-2155, cited on page 3 of the present
application

2) The subject matter of Claims 1-4 appears to be novel
and to involve an inventive step (PCT Article 33(2)
and (3)).

D1 merely discloses the use of ribozymes as reporter
molecules for the detection of biomolecules. In an
embodiment, in which the biomolecule assayed is a
nucleic acid, it is suggested that the functionally
active ribozyme can be created from two
oligonucleotides which are only brought together by

the assayed nucleic acid (see page 25, final paragraph ff.).

D2 merely uses ribozymes as markers in specific binding assays. A double-strand DNA sequence forms the "template" in ribozyme synthesis.

D3 merely describes methods for the replication of RNA. In an embodiment, a primer can contain a DNA sequence, which serves as a "template" for a ribozyme (page 17, lines 15ff.).

D4 relates to fluorescence resonance energy transfer (FRET) for tracking ribozyme reactions in real time. Only under certain special conditions, *inter alia* in the presence of 10% EtOH, was it possible to observe a hammerhead RNA splitting reaction (see page 1842).

D5 already suggests an approach for real time detection of NASBA-amplified DNA, in which a dual-labelled fluorescent probe is used.

The present applicant appears to be the first to have realised that, in the method as per D5, a number of problems could occur (see page 3, line 14ff.) which could lead to false positive results and only a very poor quantification. A person skilled in the art, equipped with the knowledge from D1 - D5, would not have had any evident motivation for modifying the method from D4, and furthermore, no motivation at all to do so using the technology from D4, which is beset with uncertainties and limitations. D1 - D3 also fail to offer a starting point for taking into consideration amplification-detection reactions in which two motifs on different

nucleic acids are required to form the ribozyme (see also present description, paragraph that runs from the bottom of page 8 to the top of page 9).

The new amplification methods as per Claims 1 - 4, which are all based on the same principle, can therefore be considered inventive.

- 3) The kits from Claims 16 - 19 appear to be novel with respect to known prior art (PCT Article 33(2)) and, furthermore, are specially adapted to the methods from Claims 1 - 4. Accordingly, the presence of an inventive step can be recognised (PCT Article 33(3)).
- 4) Claims 5 - 11 and 20 - 29 meet the requirements of novelty and inventive step by virtue of their being dependent claims ((PCT Article 33(2), (3) and (4))).
- 5) The method as per Claim 12 and as per dependent Claims 13 - 15 also meets the requirements of PCT Article 33(2), and (3) for novelty and the presence of an inventive step.

A person skilled in the art, equipped with the knowledge from the prior art (see point 2 above), especially D4, would not have had any guidance on assaying organisms via a 5'-GAAA-3' ribozyme motif in the 16s RNA and would not have had great prospects of success in transferring to complex biological systems the technology from D4, which relates to special conditions,.

To recap, D4 (page 1842; Figures) discloses a nucleic acid that has the sequence motif A and also

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 99/07127

a probe having sequence motif B, and reporter- and quencher molecules. Since a functional hammerhead ribozyme is only produced by interaction of the two nucleic acids via hybridisation (see Fig. 6), the presence of the first nucleic acid is demonstrated in the fluorescence reaction.

- 6) This report has been established on the assumption that all the claims enjoy the priority of the filing date of the priority document (26 March 1999). Should this later prove not to be the case, the document cited in the international search report "ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, DE, VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, Vol. 38, No. 9, 03 May 1999 (1999-05-03), pages 1300-1303" could become relevant.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07127

VI. Certain documents cited**1. Certain published documents (Rule 70.10)**

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO-A-9947704	23 September 1999 (23.09.1999)	17 March 1999 (17.03.1999)	17 March 1998 (17.03.1998)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 99/07127**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

- 1) Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite D3 and D4 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 99/07127**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

- 1) The common names of the dyes in Claims 11, 15 and 29 do not allow a clear-cut definition of the basic chemical substances involved (PCT Article 6).
- 2) The use of brand names in Claims 10, 25 – 27 (here: NASBA®) leads to a lack of clarity with respect to the scope of the claims in question, since the former could refer to various process variants (PCT Guidelines C-II, 4.16; PCT Article 6).